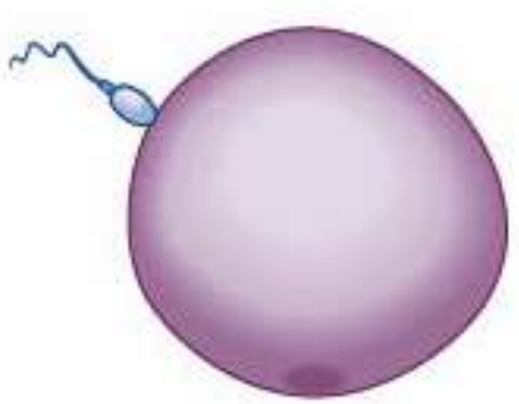
Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Fachbereich biologie
Institut für pflanzenwissenschaften
und mikrobiologie



Entwicklungsbiologie
Sommersemester 2020

# Befruchtung und Frühentwicklung

# Was bisher geschah:

- Entwicklung = Differenzierung, Morphogenese, Wachstum
- Geschichte der Entwicklungsbiologie
- Soma vs. Keimbahn
- Spermatocyten und Oozyten gehen aus Urkeimzellen hervor
- Gametogenese: Spermatogenese + Oogenese

# Heutige Themen:

- Der Beginn des Lebens: Befruchtung
- Die ersten Schritte: Furchungsteilung(en)
- Gestaltbildung: Gastrulation + Organogenese
- Modell: v.a. Seeigel

# Entwicklung beginnt mit der Befruchtung

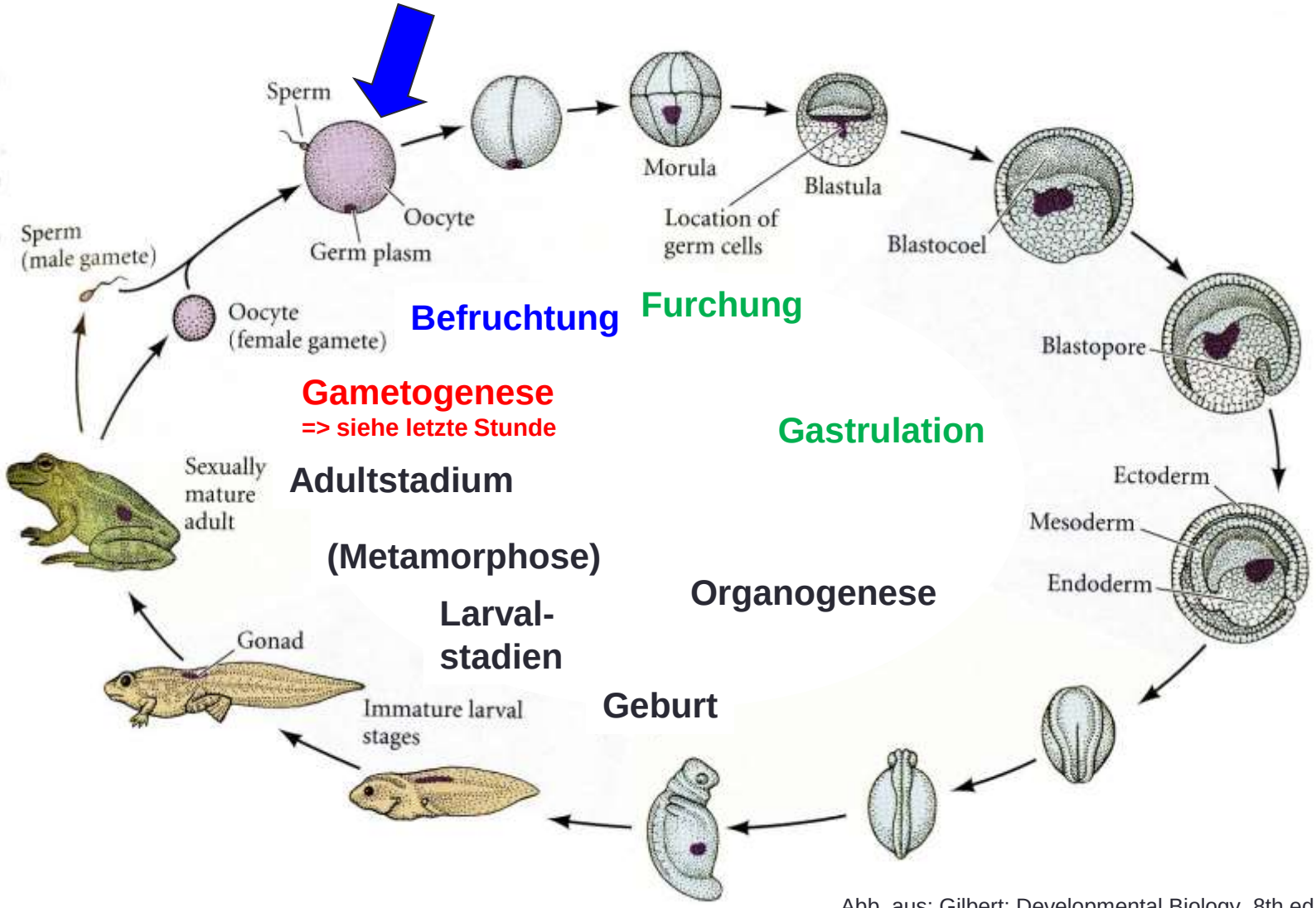



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Seeigel

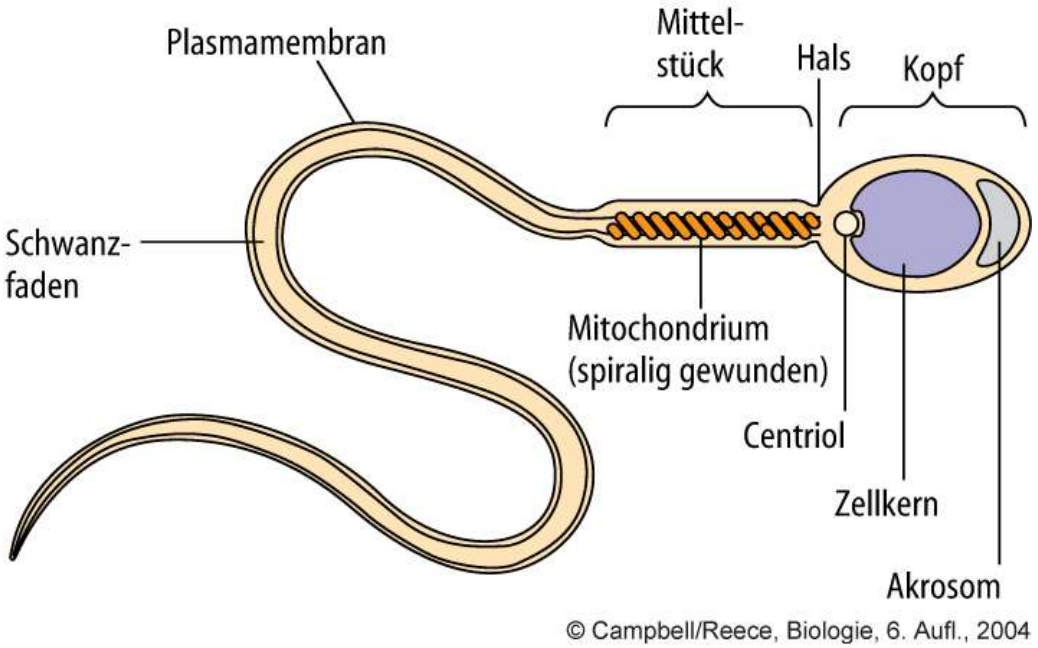
= Modellsystem für Befruchtung und Frühentwicklung

**Vorteile:**

- kann durch **KCl**-Injektion zum Ablaichen gebracht werden
- **durchsichtige** (allerdings kleine) Eizelle => Beobachtung der Befruchtung und Furchung möglich
- Gallerthülle leicht zu entfernen

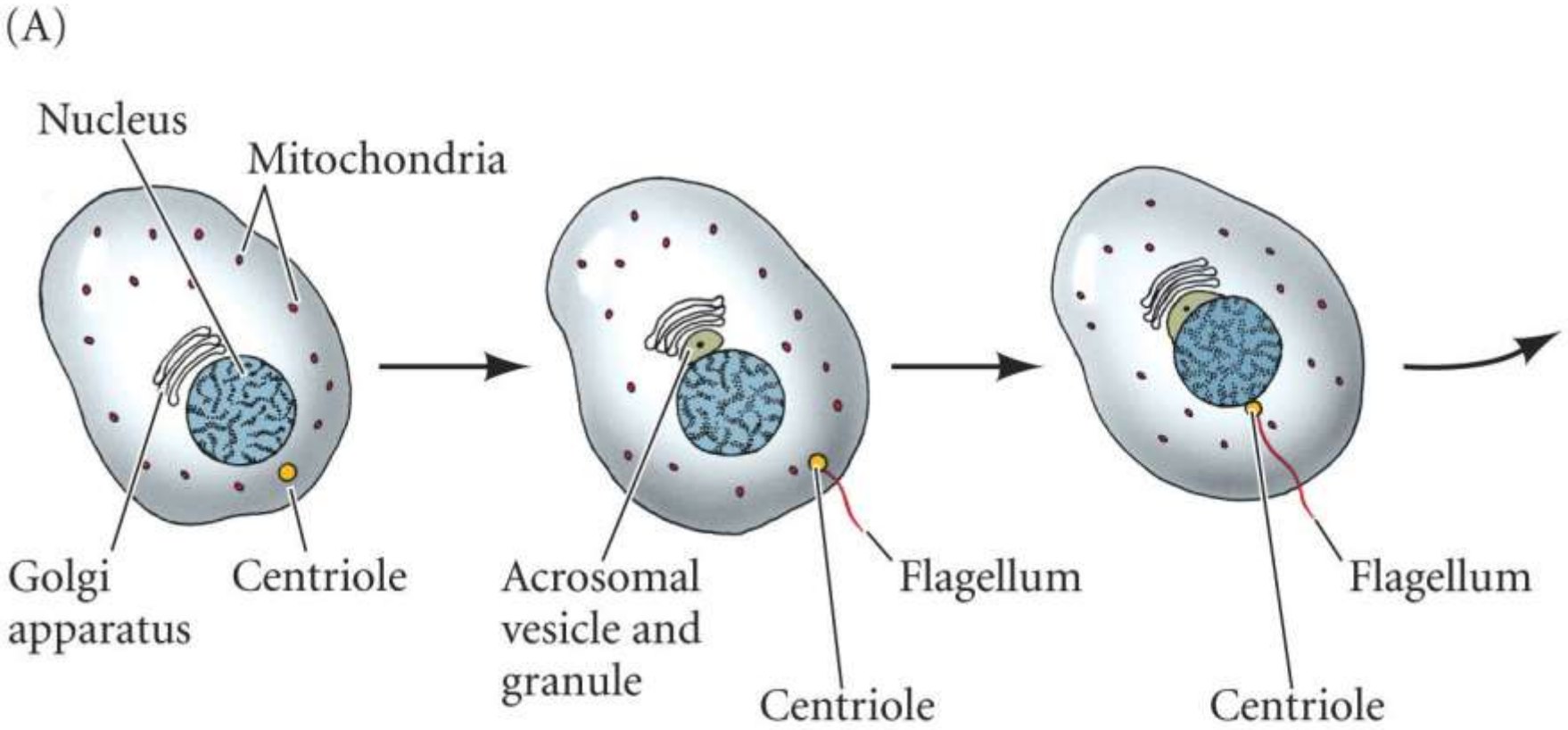
# Die Gameten

## Spermium



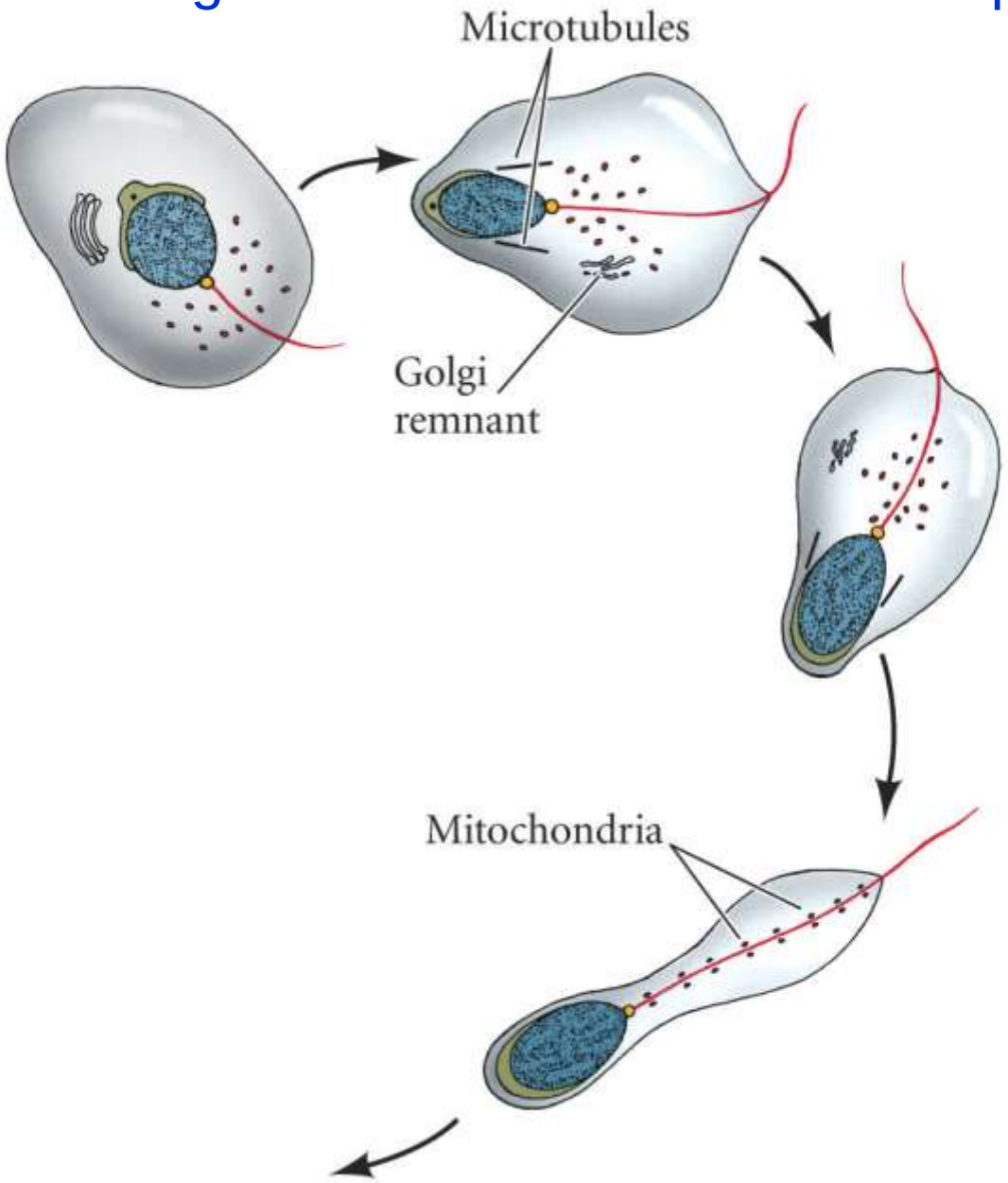

- Transport der väterlichen **DNA**
- Bereitstellung eines **Centriolenpaares**, wichtig für die Spindelausbildung

# The modification of a germ cell to form a mammalian sperm (Part 1)

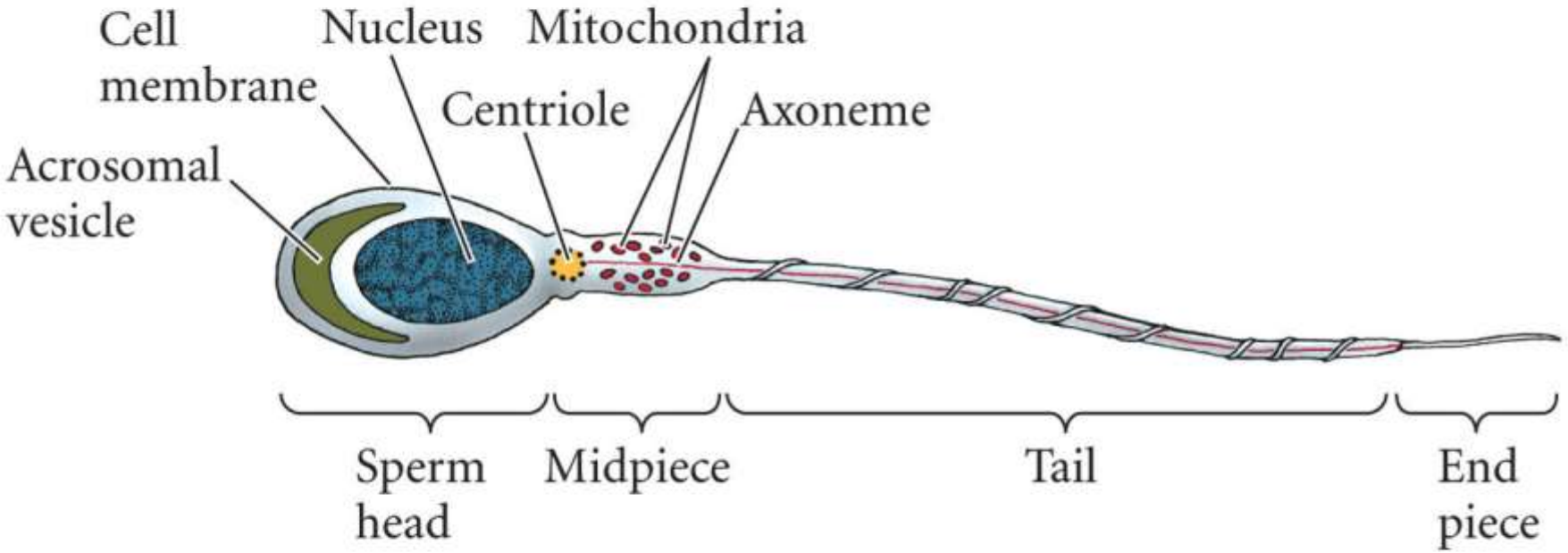



DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 7.2 (Part 1) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

# The modification of a germ cell to form a mammalian sperm (Part 2)

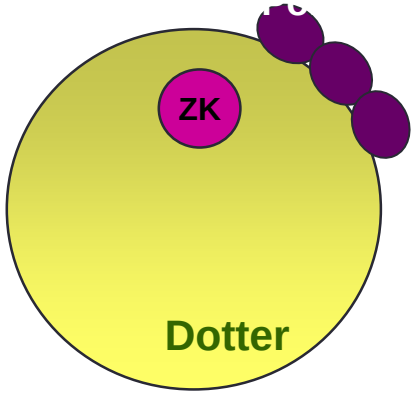


# The modification of a germ cell to form a mammalian sperm (Part 3)




*DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition*, Figure 7.2 (Part 3) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

# Die Gameten **Eizelle**




- Transport der mütterlichen **DNA**
- **Dotterproteine**: in anderen Organen hergestellt (z.B. Leber, Fettkörper); werden durch maternales Blut in die Eizelle transportiert.
- **Ribosomen und tRNA**: Bildung von Strukturproteinen und Enzymen durch frühe Proteinsynthese nach der Befruchtung. Bestimmte amphibische Eizellen produzieren $10^{12}$ Ribosomen in der meiotischen Prophase I.
- **mRNAs:** Es wird geschätzt, dass Seeigel-Eier > 1000 verschiedene mRNAs akkumulieren, die erst nach Befruchtung translatiert werden.
- **Transkriptionsfaktoren** und **Hormone**: Morphogene Faktoren, die die Differenzierung steuern
- **Schutzsubstanzen**: Ultraviolettfilter und DNA-Reparaturenzyme, die vor Sonnenlicht schützen.

# Besamung und Befruchtung

**Besamung:**
Freisetzung des Spermiums bis Befruchtung

**Befruchtung:** Fusion Spermium + Eizelle

**Gallerthülle**: Schutz

**Vitellinmembran**: umgibt **Zellmembran**, bildet Befruchtungs-membran

**Corticalgranula**: Verhindern Polyspermie

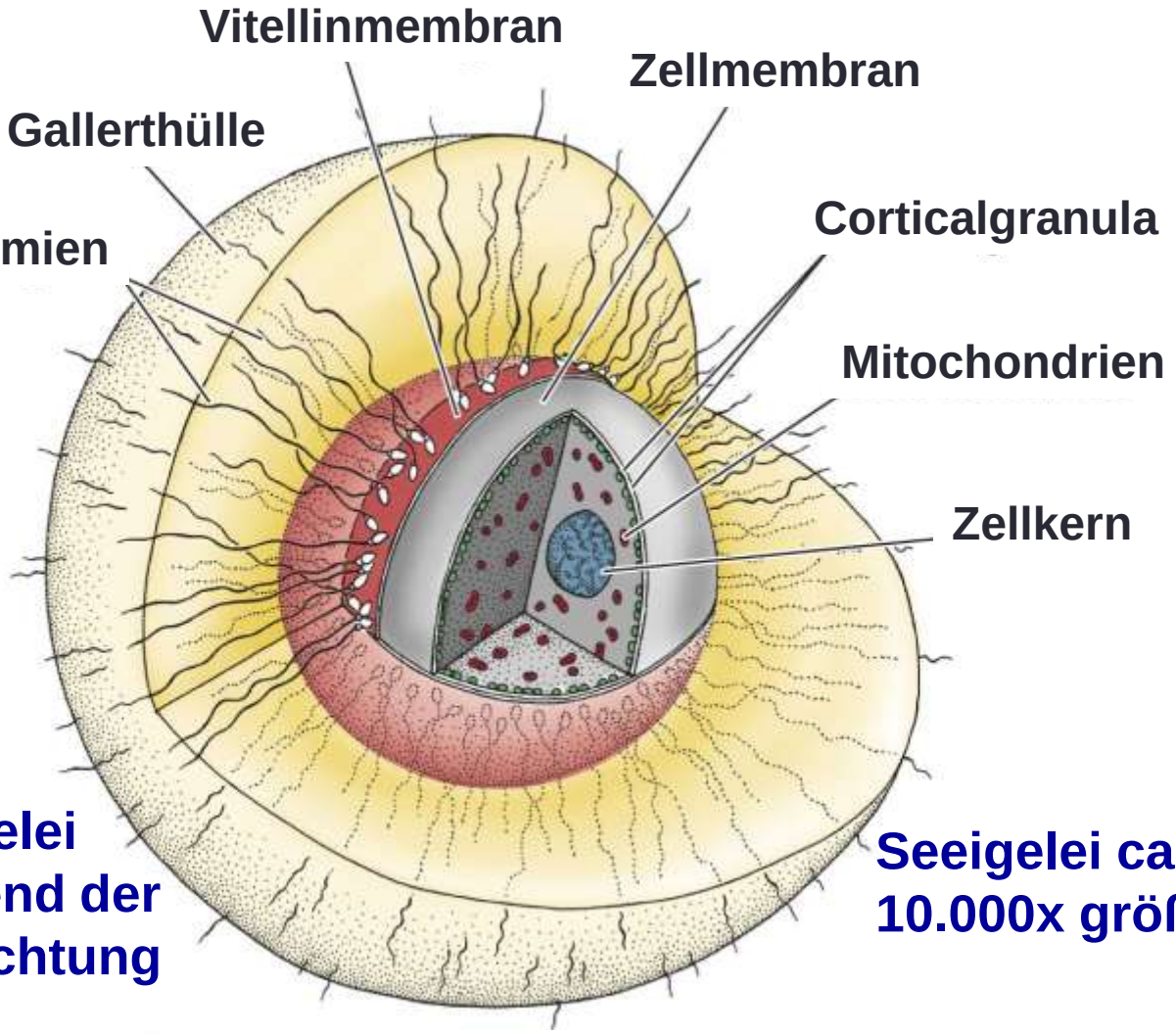
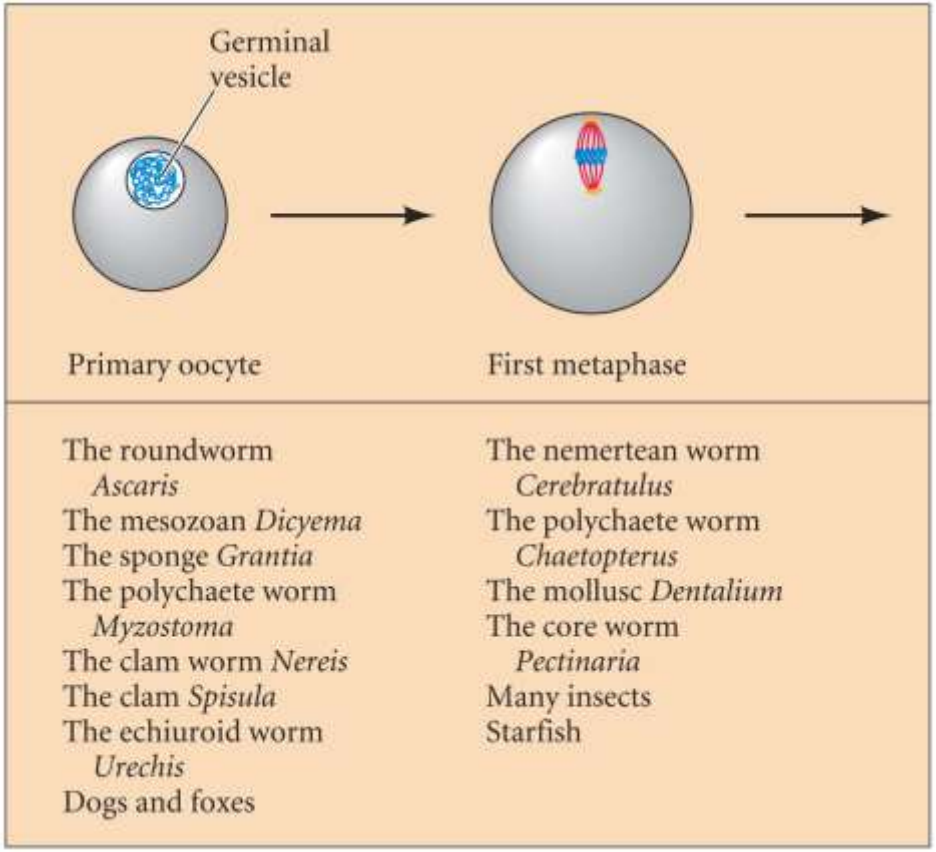



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

NTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 7.4 © 2006 Sinauer Associates, Inc.

# Wann findet die Befruchtung statt?



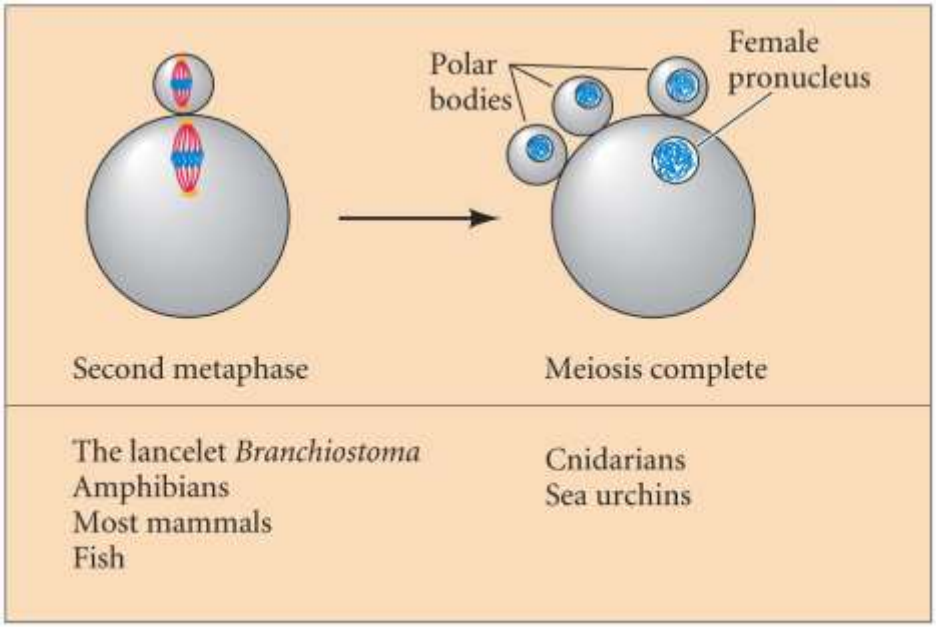




Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

- Abschluss der meiotischen Teilung z.T. erst nach Befruchtung!

# Wo findet die Befruchtung statt?

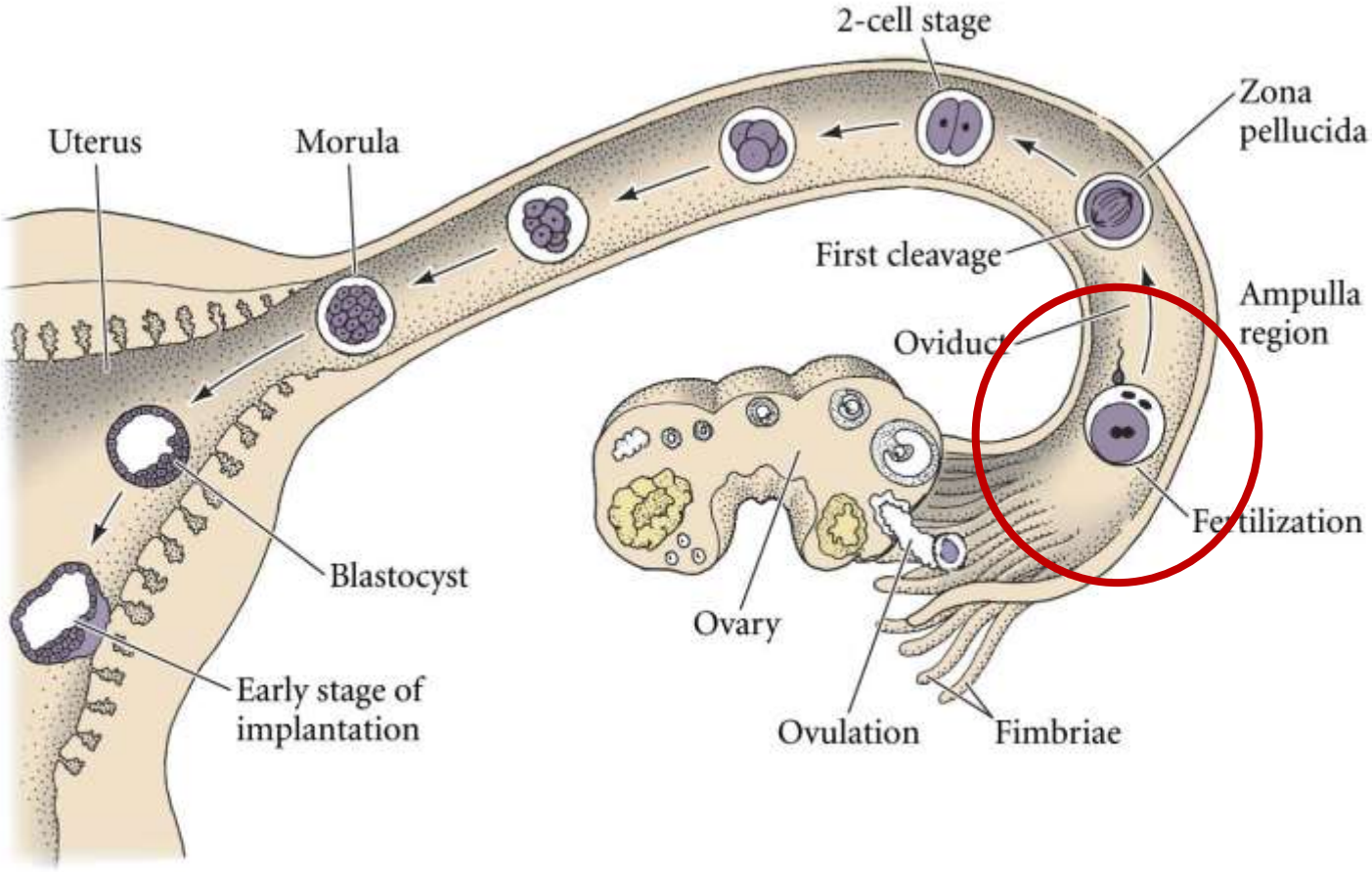
- Abgabe von Spermium und Eizelle über die aborale Platte in das Meerwasser
- Eizelle lockt Spermien mittels **Pheromon** (Gamon) an

*Strongylocentrotus purpuratus*

**Pheromon:**
$H_2N$-GFDLNGGGVG-COOH

- Pheromon artspezifisch
  => nur **arteigene** Spermien werden angelockt
- auch Säugerei lockt wahrscheinlich mit Pheromon

# Wo findet die Befruchtung statt?




DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 11.27 © 2006 Sinauer Associates, Inc.

- Oogenese: Meiose (Reduktionsteilung)
- Abschluss der Meioseteilungen z.T. erst nach Befruchtung!

# Translokalisation und Kapazitation (bei Säugern)

- Uterusmuskelkontraktionen sind entscheidend für die Translokalisation von Spermien in den Eileiter.
- Im Eileiter können Spermien kontrolliert weitergeleitet werden.
- Spermien können Temperaturgradienten wahrnehmen.
- Die Eizelle und die umgebenden Cumulus-Zellen sezernieren Lockstoffe, die die Spermien im letzten Abschnitt der Spermienwanderung in Richtung Eizelle anziehen.
- Die Beweglichkeit der Spermien nimmt drastisch zu, sobald sie in die Nähe der Eizelle geraten.
- Weitere Wechselwirkungen zwischen Eileiter und Spermium werden vermutet.

# Was ist Polyspermie?

- Befruchtung der Eizelle mit > 1 Spermium
- führt meist zu Fehlentwicklung => Absterben des Embryos
- => Das Eindringen weiterer Spermien muss verhindert werden!

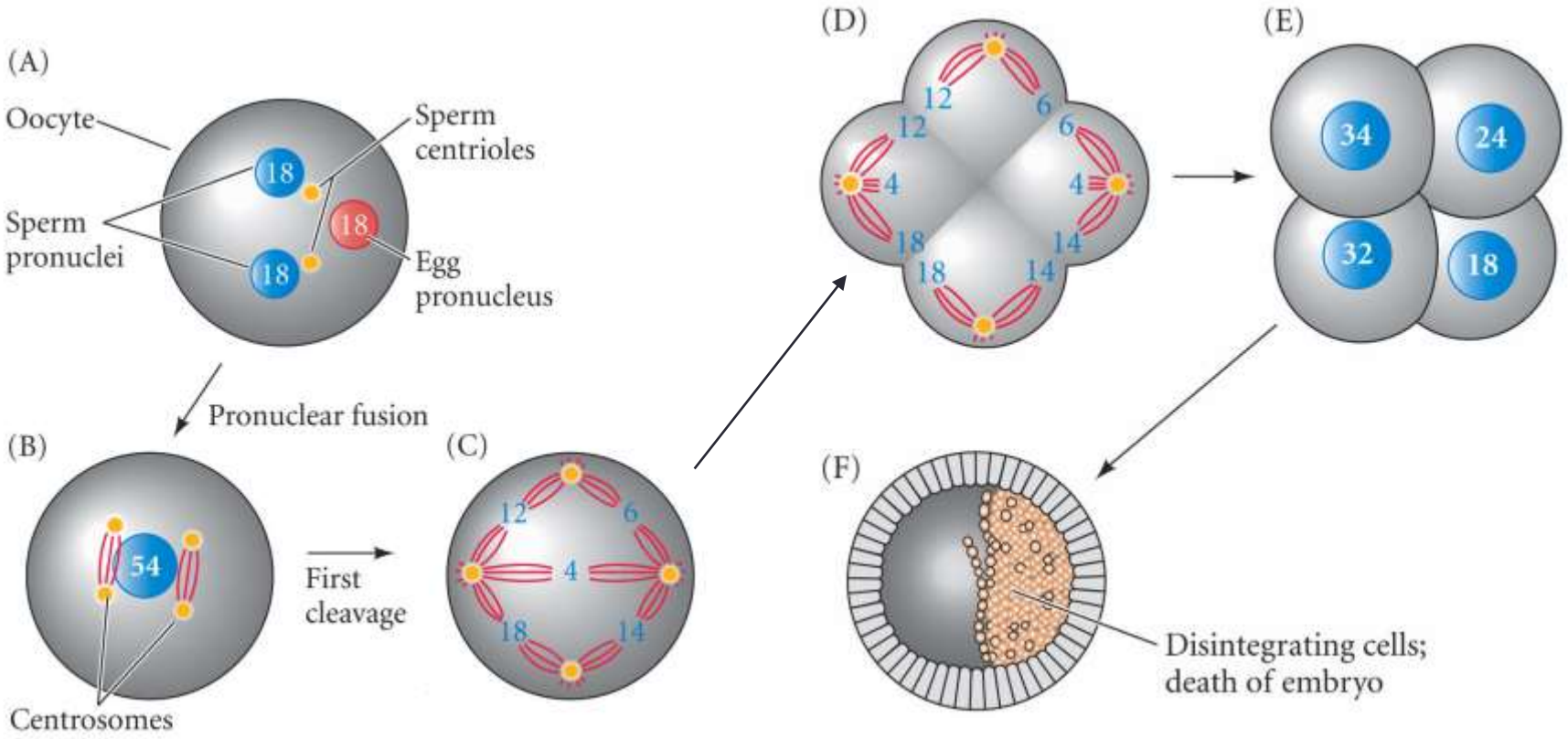
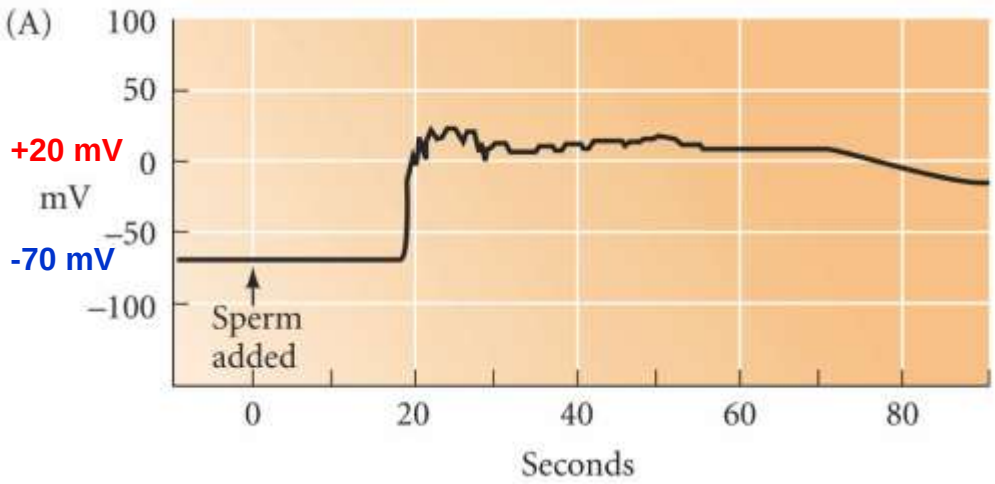



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

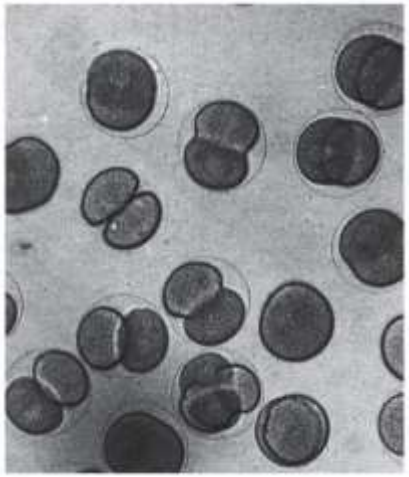
# Verhinderung der Polyspermie

## 1. Schneller Block: Depolarisierung der Zellmembran



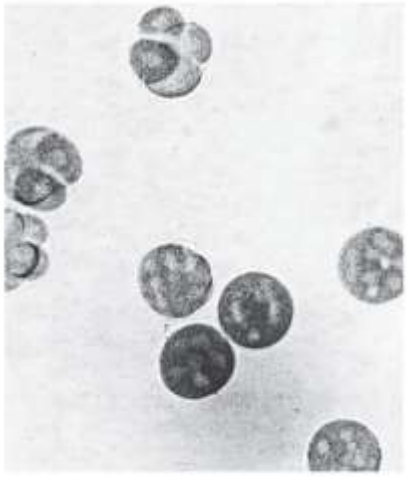

- Ruhepotential der Eizelle -70mV
- $Na^+$- Einstrom 1-3 sec nach Spermienbindung
- Depolarisation der Zellmembran
- Veränderung der Oberflächen-rezeptoren
- keine weitere Spermienbindung (z.B. Seeigel, Amphibien)

(B)



490 mM NaCl

(C)



120 mM NaCl

(D)

| $Na^+$ (m*M*) | Percentage of polyspermic eggs |
|---|---|
| 490 | 22 |
| 360 | 26 |
| 120 | 97 |
| 50 | 100 |

**Seeigeleier in Wasser**

# Verhinderung der Polyspermie

## 2. Langsamer, permanenter Block: Cortikalreaktion

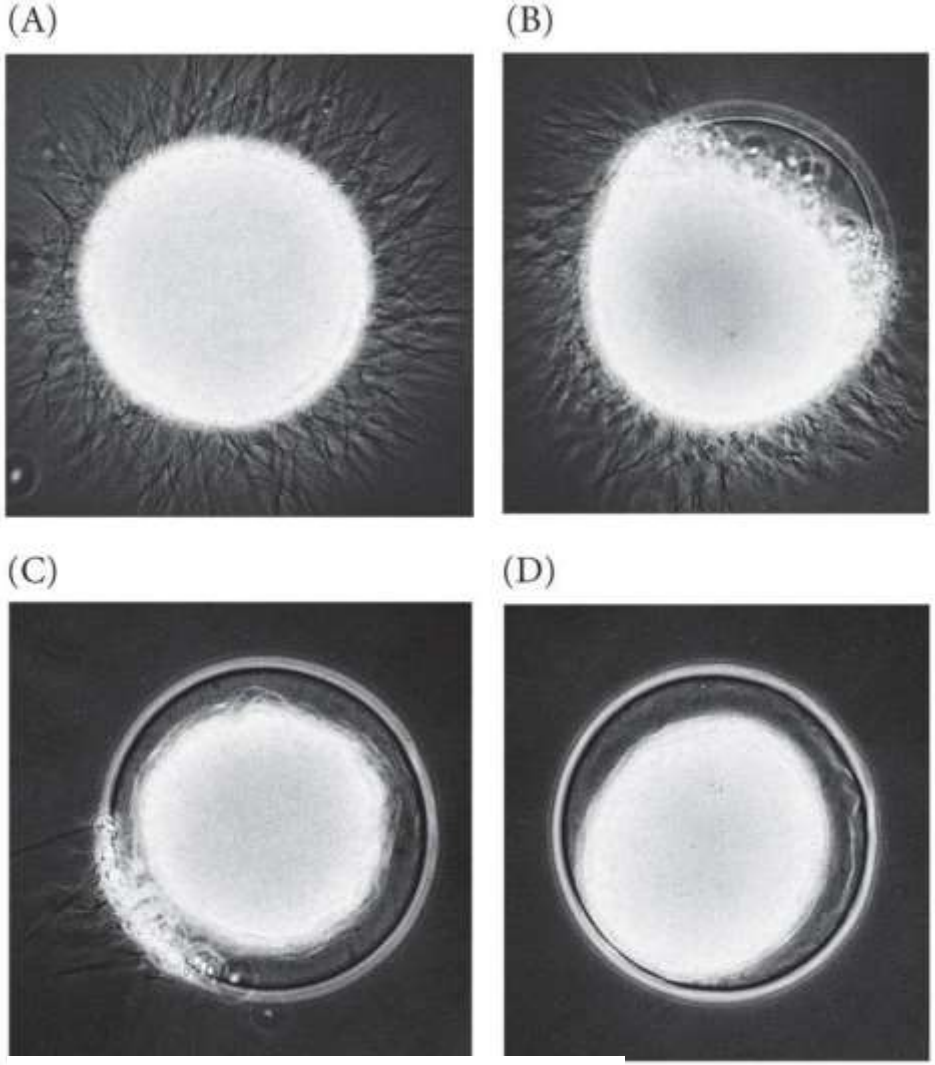



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

- Freisetzen der Cortikalgranula
- => Ausbildung der Befruchtungsmembran (10 – 60 sec)

# Akrosomreaktion

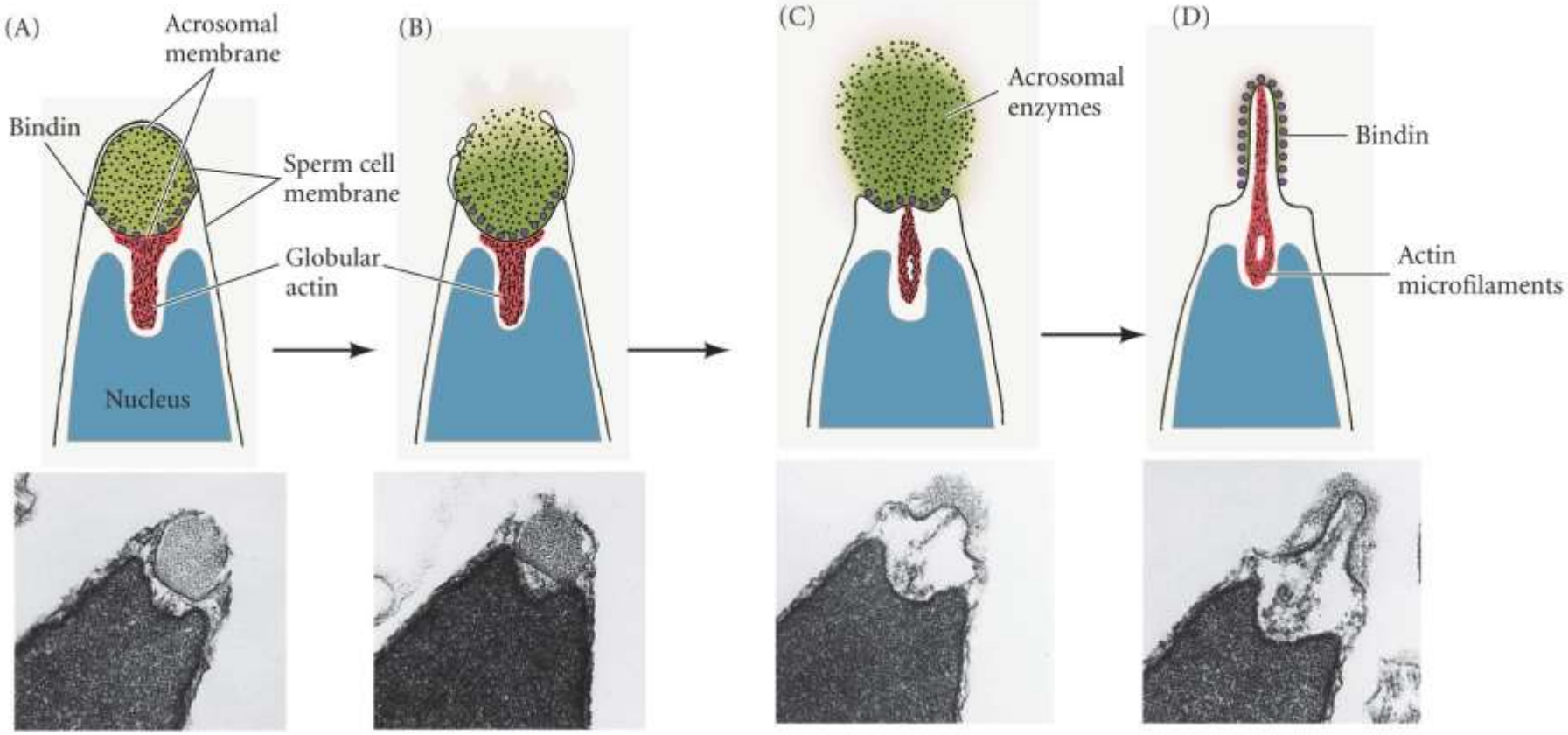



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

- Akrosom:
- Entsteht in der Spermiogenese aus dem Golgi-Apparat
- Setzt hydrolytische Enzyme, v.a. Glycosidasen und Proteasen frei => Verdau der Gallerthülle der Eizelle
- Akrosomfortsatz (Aktinfilament) ist mit **Bindin-Molekülen** versehen => Wechselwirkung mit **Bindin-Rezeptoren** an der Vitellinmembran

# Was passiert bei der Befruchtung?

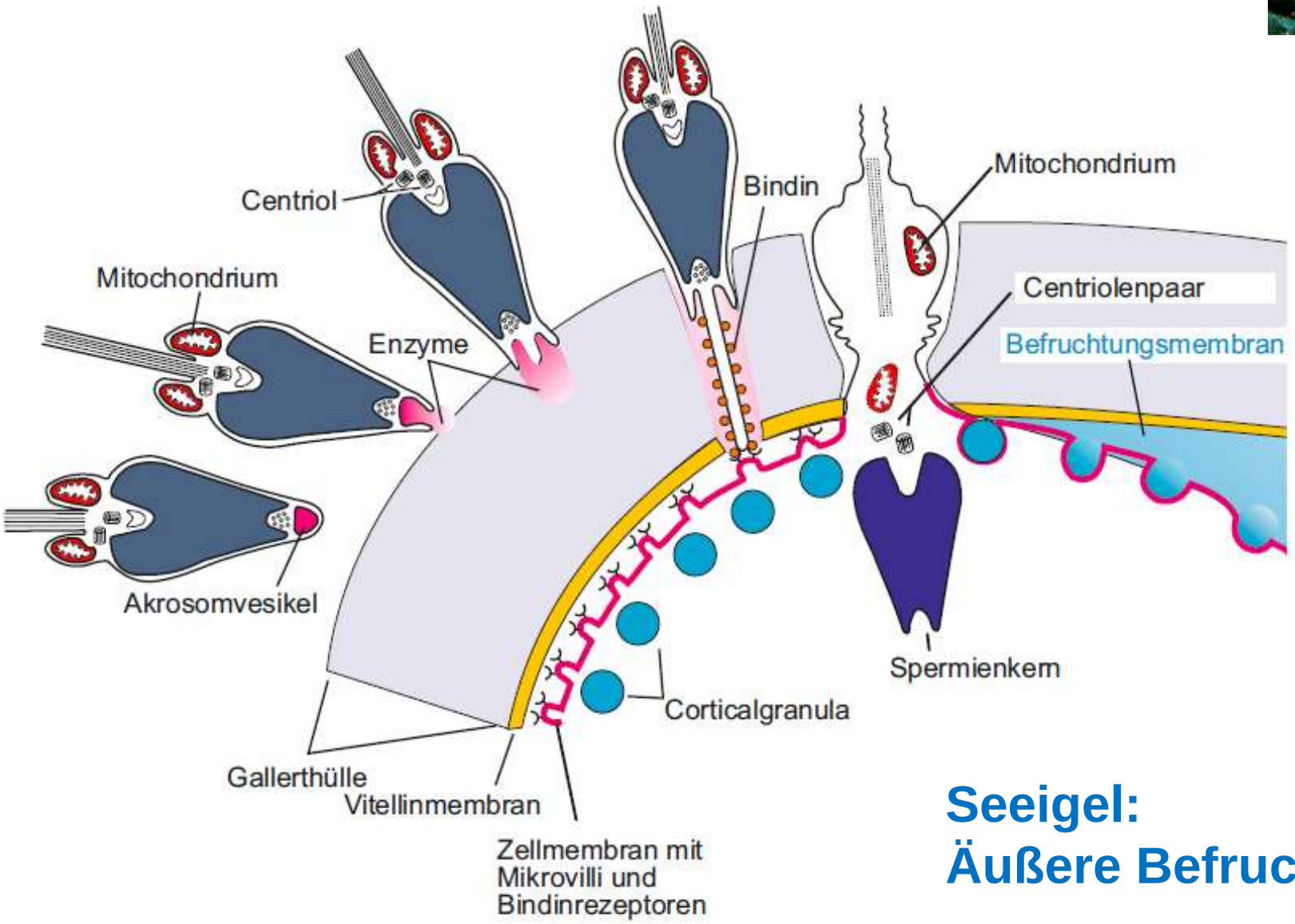
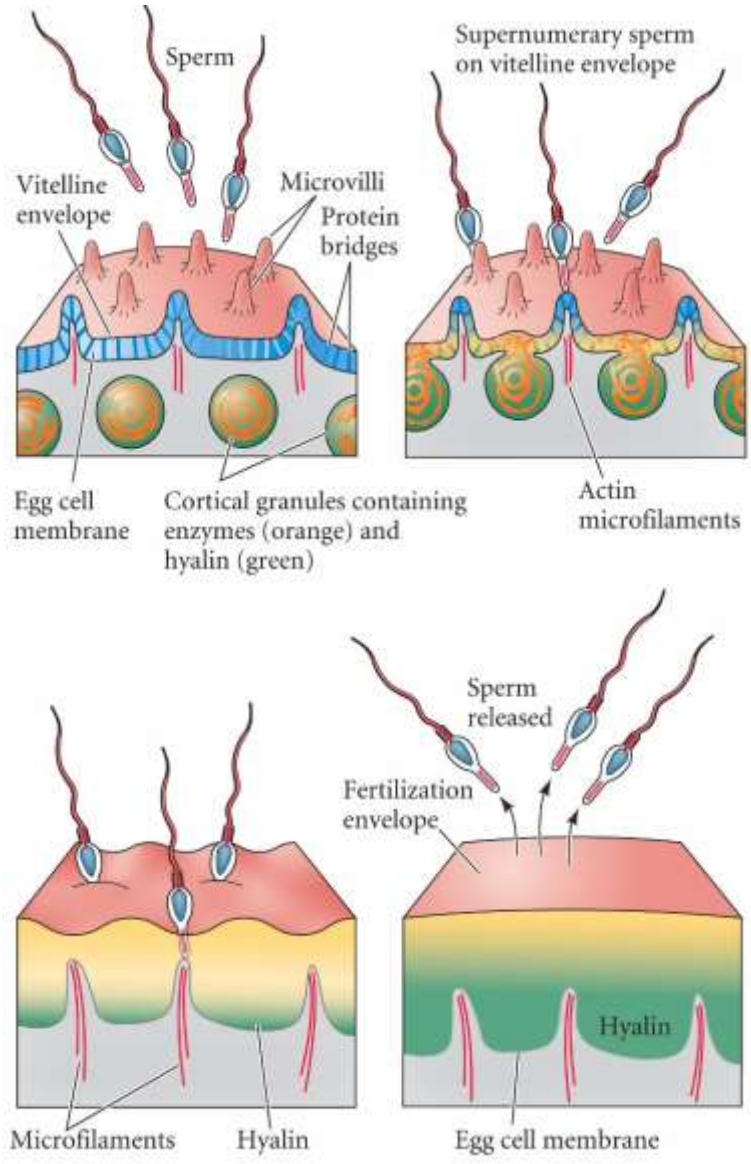



Abb. aus: Müller, Hassel: Entwicklungsbiologie, 5. Auflage

**Seeigel:**
**Äußere Befruchtung**

# Cortikalreaktion

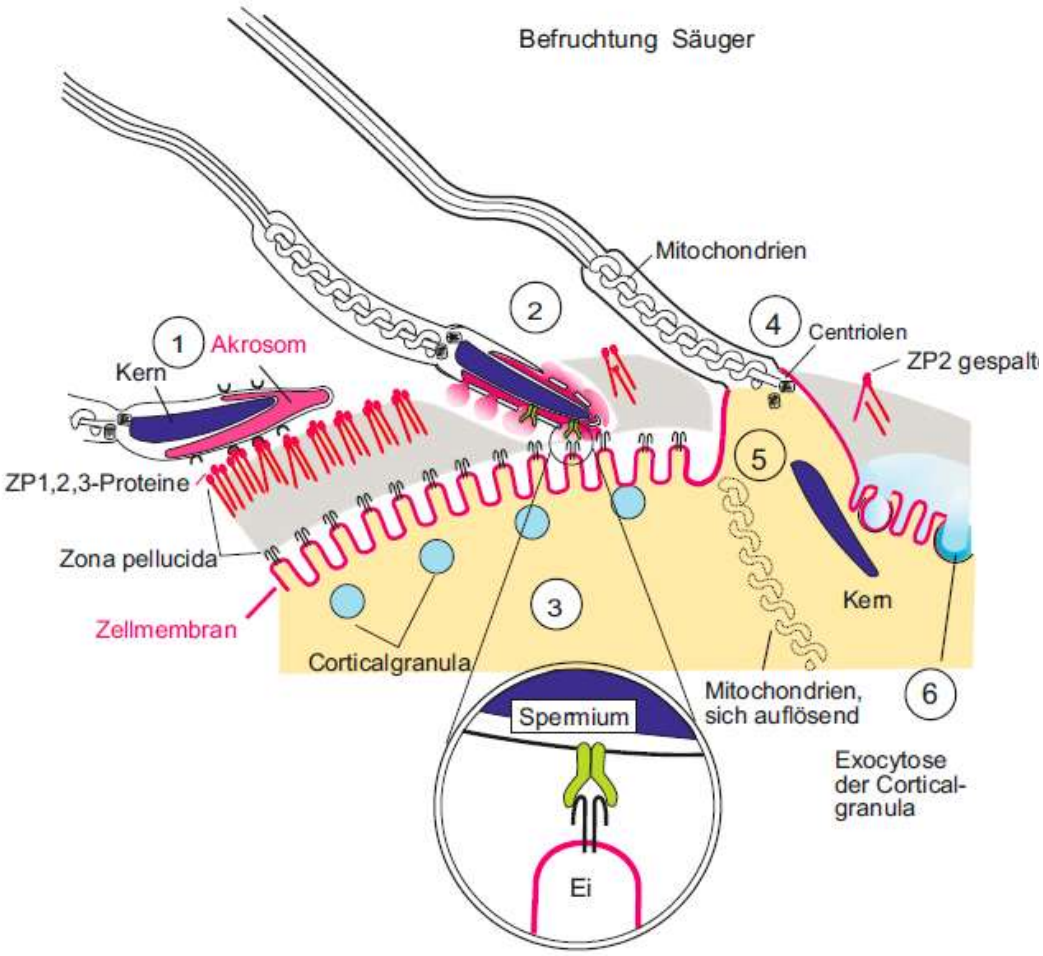



- Spermium bindet an Vitellinmembran
- Erhöhung der $Ca^{2+}$-Konzentration in der Eizelle (Aktivierung der Eizelle) aus ER
- Cortikalgranula verschmelzen mit Eizell-membran ($Ca^{2+}$-vermittelt)
- Enzyme und hoch-glykosylierte Proteine (Hyalin) werden freigesetzt:
- Ablösen der Vitellinmembran von der Eizellmembran
- Quellen der der Hyalin-Schicht
- Inaktivierung der Bindin-Rezeptoren
- Aushärtung der Vitellinmembran

=> Verhinderung des Eintritts weiterer Spermien

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Befruchtung bei Säugern




Ähnlich, aber mit einigen Unterschieden:

- Innere Befruchtung, mit notwendiger Kapazitation
- Spermien müssen zuerst Follikelzellen durchdringen, danach die Zona pelludica
- Bindin = Fertillin
- ZP3 = Spermienrezeptor in der Zona pelludica
- Kortikalreaktion: Keine Abhebung einer Befruchtungshülle sondern enzymatisch bedingte Aushärtung der Zona pellucida

Abb. aus: Müller, Hassel: Entwicklungsbiologie, 5. Auflage

# Eiaktivierung

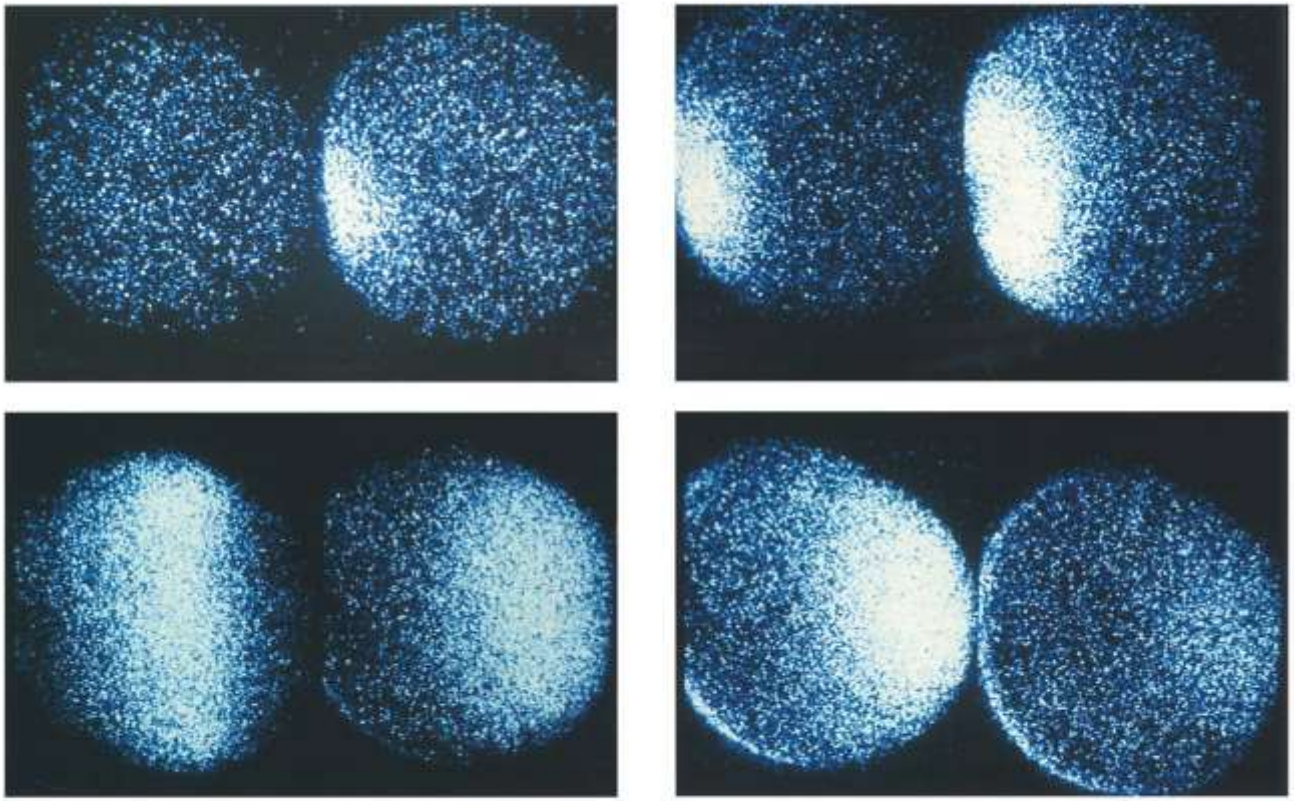
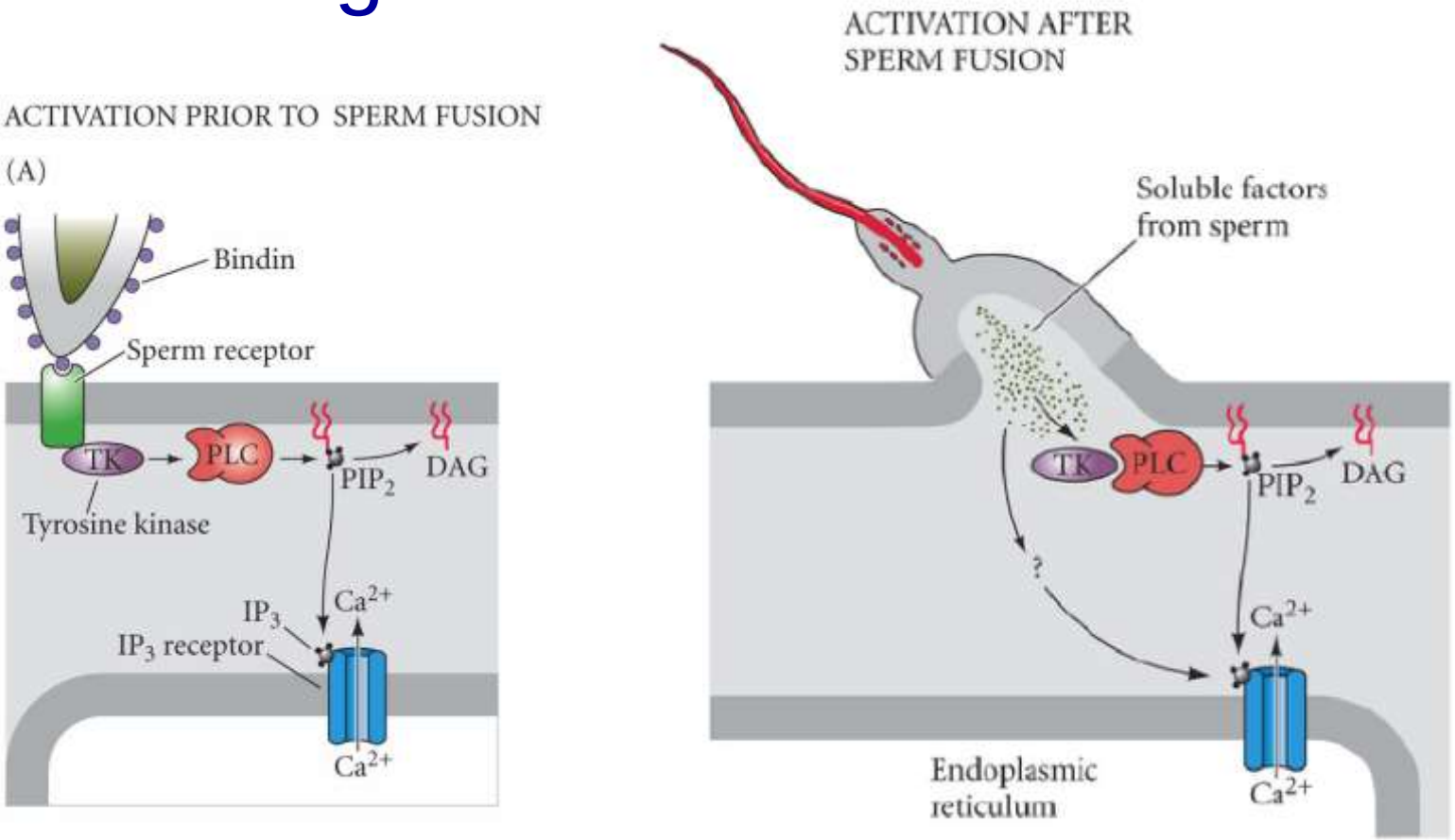


Abb. aus: Gilbert:
Developmental Biology, 8th ed.

- unbefruchtetes Ei: sehr geringe Stoffwechselaktivität
- Aktivierung des Eis durch Spermienkontakt
- Anstieg der $Ca^{2+}$-Konzentration durch wellenartige Freisetzung aus dem ER => Induktion Stoffwechsel: Zellatmung, Transkription und Translation

# Eiaktivierung: $IP_3$ vermittelt $Ca^{2+}$-Freisetzung aus dem ER

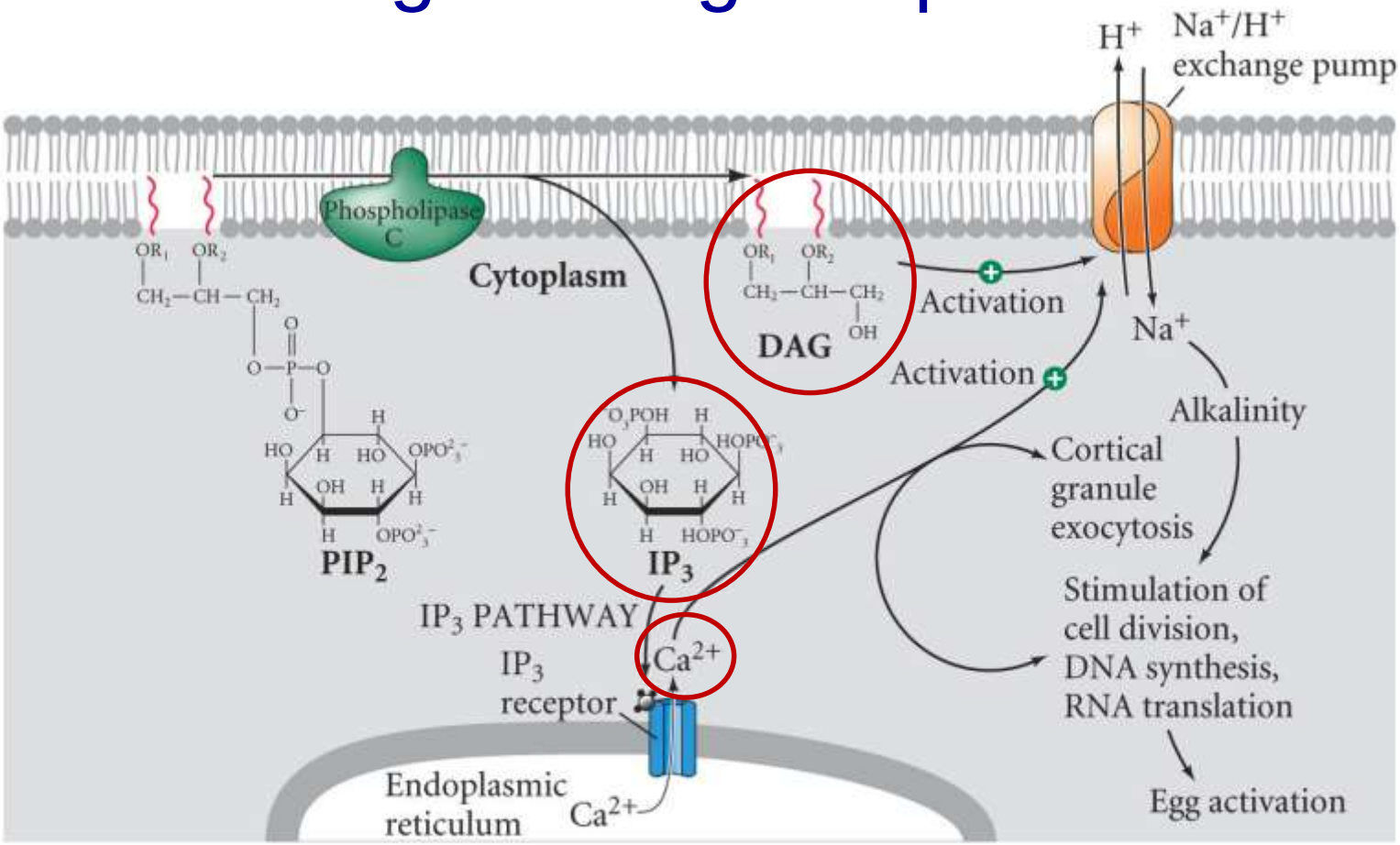



**TK** = Tyrosinkinase
**PLC** = Phospholipase C

$PIP_2$ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
$IP_3$ = Inositol-1,4,5-triphosphat
DAG = Diacylglycerin

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Eiaktivierung: Anstieg des pH-Werts

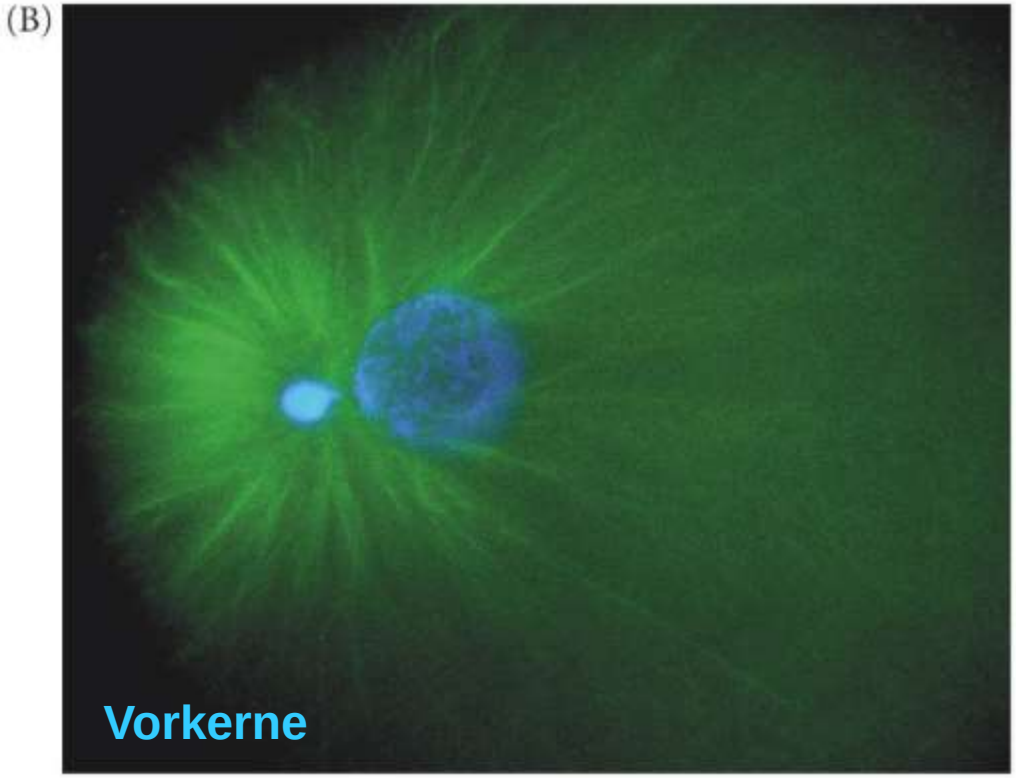



DAG und $Ca^{2+}$ aktivieren $Na^+/H^+$-Pumpe (NHE)

=> Ausstrom von $H^+$ => Alkalisierung des Ooplasma

=> Induktion der Translation, DNA-Synthese + Zellteilung

# Fusion der Vorkerne




**Nach Befruchtung:**

- Desintegration der ♂ Mitochondrien
- Centrosom aus Spermium
- haploide ♂ und ♀ Vorkerne
  => Fusion zu diploiden Zygotenkern

# Die ersten Schritte: Furchungsteilung

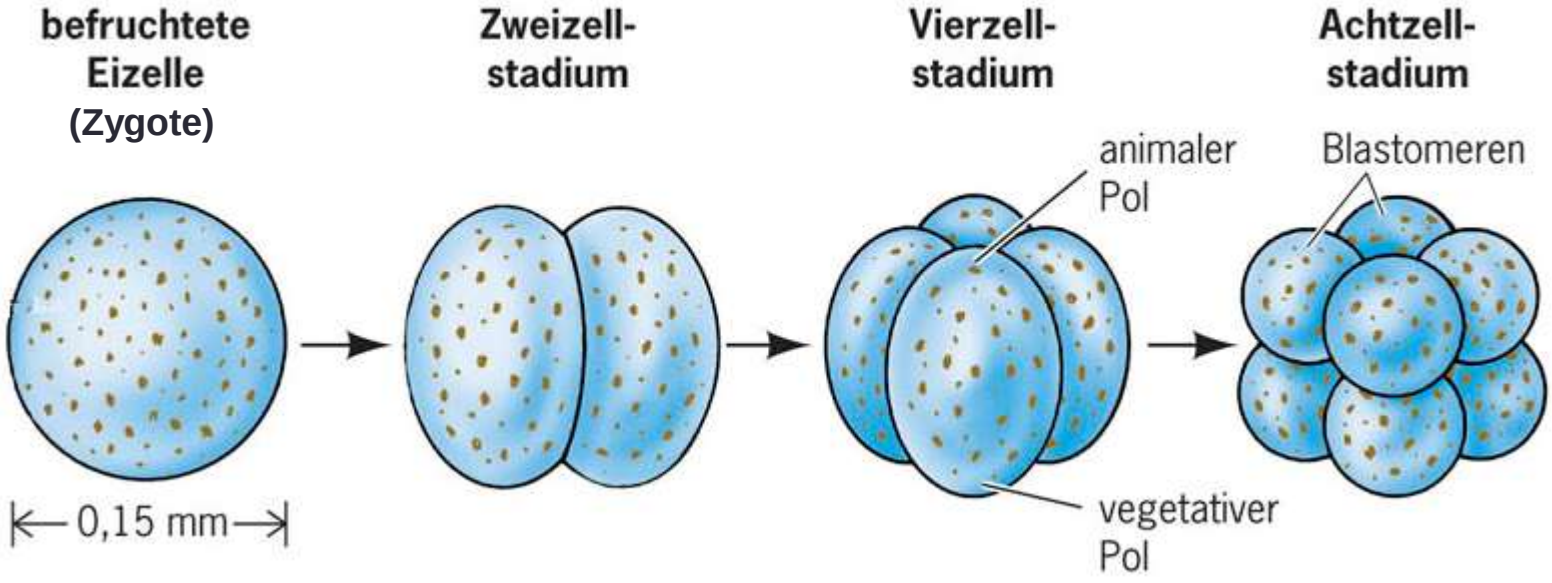
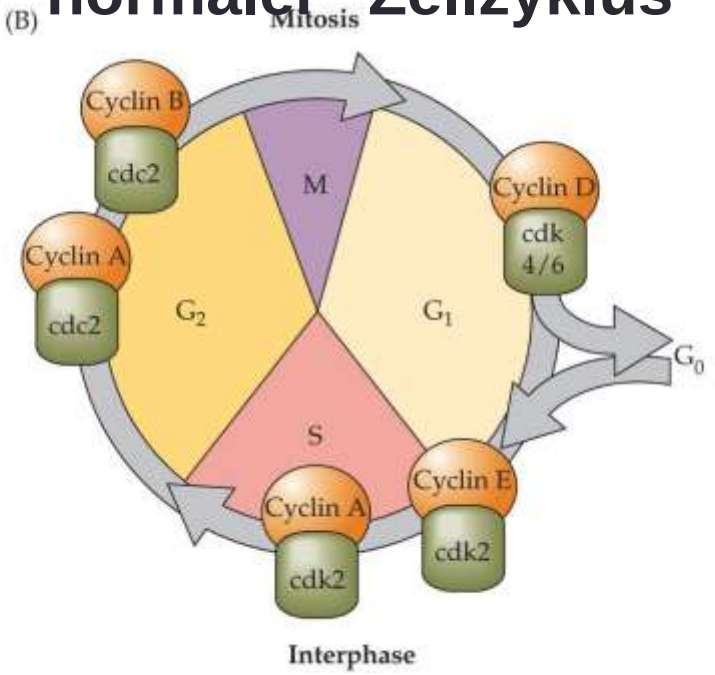



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

- **Furchungen** = erste, schnelle **Teilungen** der Zygote **ohne Wachstum** des Embryos
- => viele Zellen = Blastomeren ("Blastula")
- Steht unter der Kontrolle maternaler Faktoren
- Die Art der Furchung hängt vom Ei-Typ ab

# Zellzyklus in der Furchung

**"normaler" Zellzyklus** **Zellzyklus in der Furchung**



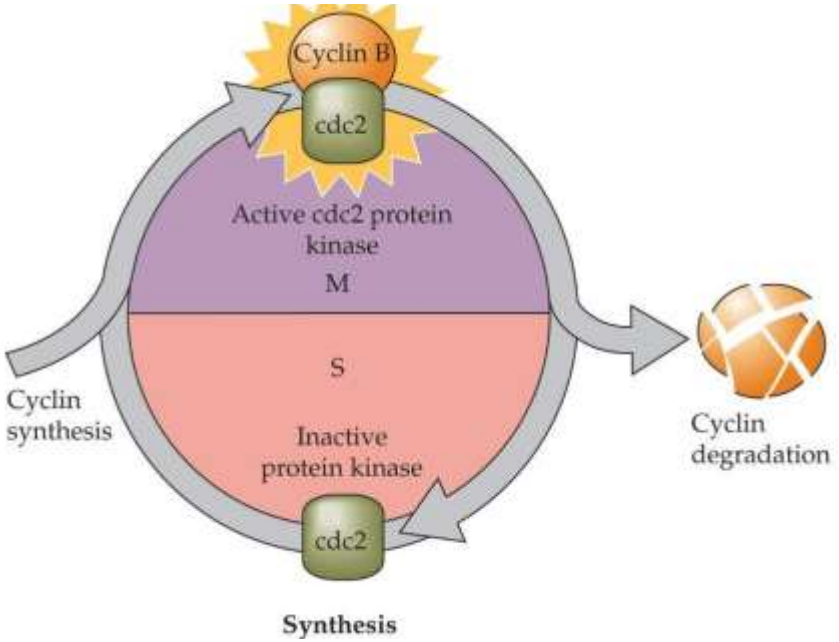
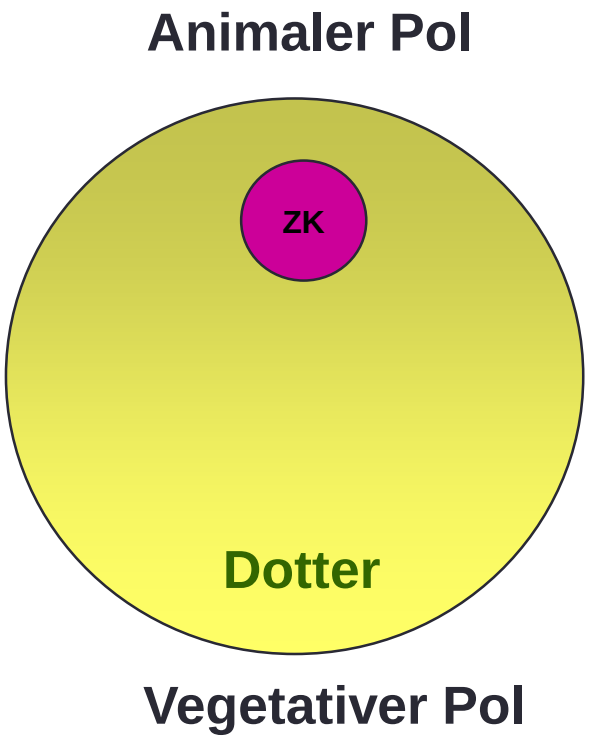




Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

- In den Furchungsteilungen keine G1 und G2-Phasen (nur S- und M-Phasen)
- Nach Befruchtung ausgelöst durch "**Mitosis promoting factor**" (MPF)
- MPF = **Cyclin B + cdc2** => kontrolliert Mitose durch Phosphorylierung (Histone, Lamine, Myosin II)
- Cyclin B akkumuliert in S-Pase, Abbau nach Zellteilung
- Normale Mitose: verschiedene Cycline und cdc ("*cell division cycle genes*")

# Furchungstypen

- Furchung ("cleavage")
- Bestimmt von der Positionierung der **Mitosespindel**
- diese wiederum v.a. abhängig vom Dotter**gehalt** und Dotter**verteilung**
- => Furchungstyp von Dottergehalt und Verteilung bestimmt



# Furchungstypen

## => Abhängigkeit vom Dotter

### 1.) Dottergehalt

| | |
|---|---|
| wenig | oligolecithal |
| mittel | mesolecithal |
| viel | polylecithal |

### 2.) Dotterverteilung

| | |
|---|---|
| homogen | isolecithal |
| am vegetativen Pol | telolecithal |
| im Zentrum | centrolecithal |

# Furchungstypen

## => Festlegung des Entwicklungsschicksals

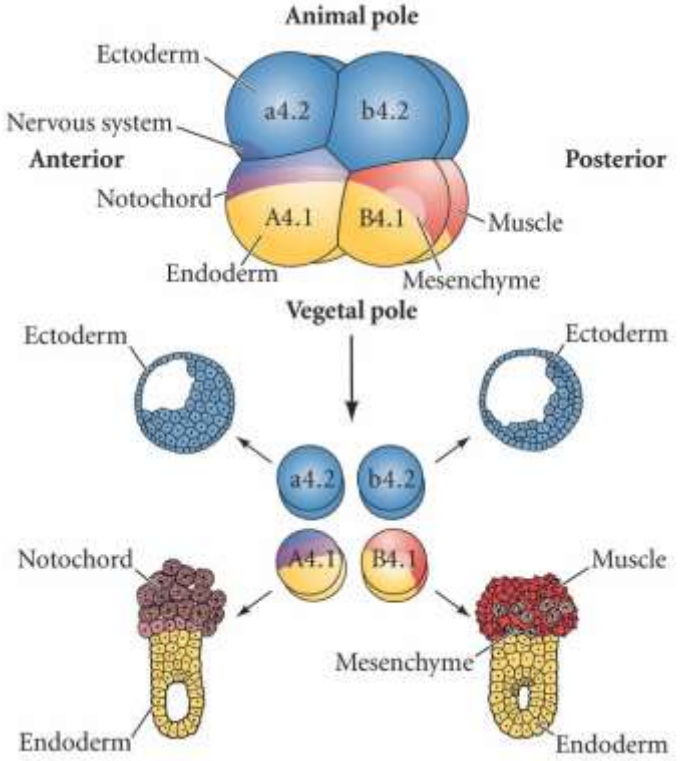
## Determinierend oder regulativ?

**1) Mosaikentwicklung:**

- cytoplasmatische Determinanten programmieren Entwicklungsrichtung
- Entwicklung der Zellen ± autonom
- "Mosaikkeim"

**2) Regulationsentwicklung:**

- späte Determination des Zellschicksals
- Zell-Zellinteraktionen




**Mosaik**keim
eines Tunikaten

# Furchungstypen

## => Phylogenetische Korrelation

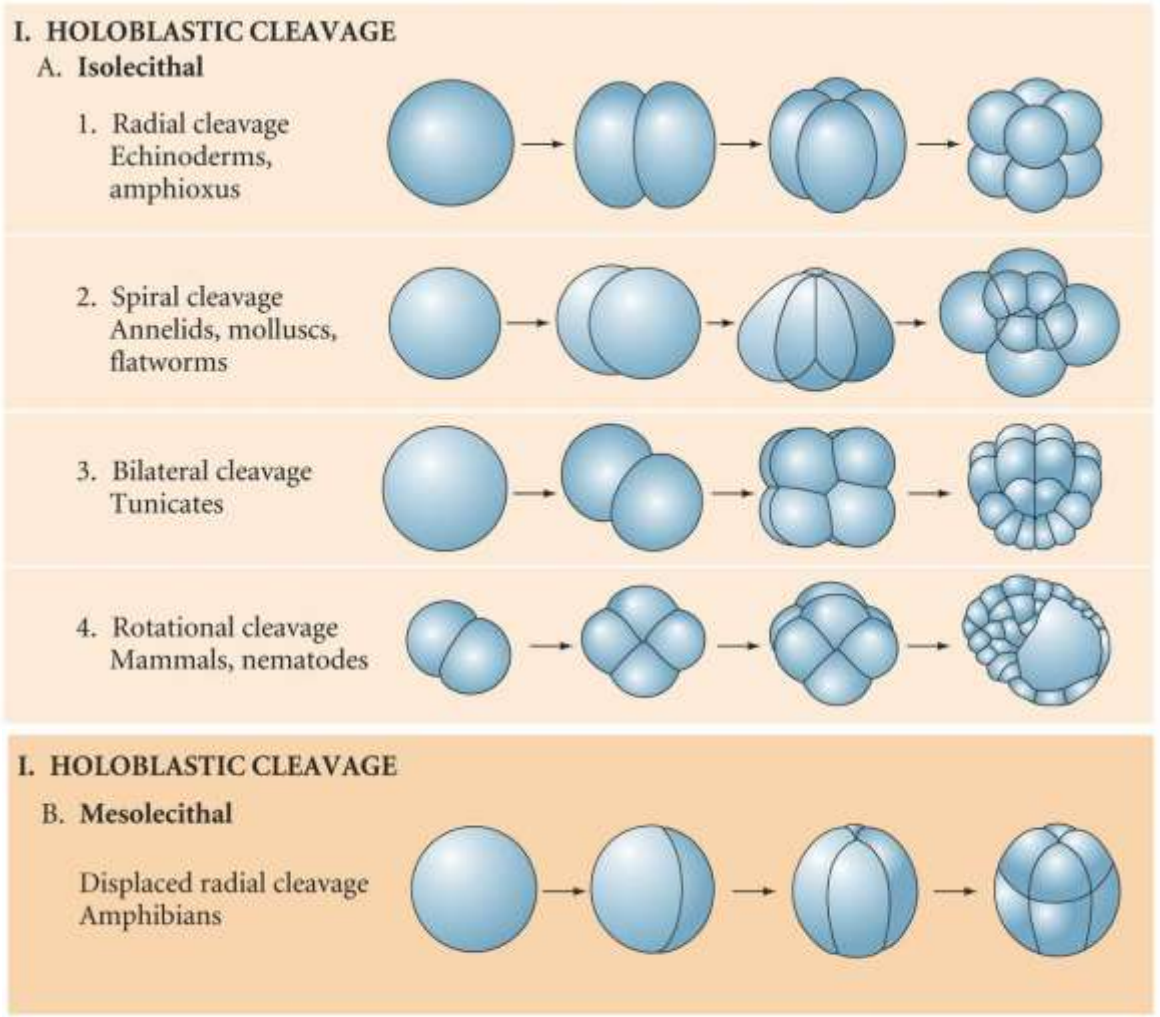
- Mitglieder eines Tierstamms haben in der Regel ähnliche Furchungstypen

- **Protostomia** (Urmundtiere) haben allgemein:
  - determinierende Furchung
  - Mosaikentwicklung

- **Deuterostomia** (Neumundtiere) haben allgemein:
  - nicht-determinierte Furchung
  - Regulationsentwicklung

# Holoblastische Furchungen

- **holoblastische Furchung** = vollständige Durchteilung in 2 Blastomeren
- nur bei oligo- und mesolecithalen Eiern möglich




**Radiärfurchung**

**Spiralfurchung**

**Bilateralfurchung**

**Rotationalfurchung**

**Inäquale Radiärfurchung**

Abb. aus: Gilbert:, Developmental Biology, 8th ed.

# Meroblastische Furchungen

- Eier polylecithal => keine vollständige Teilung möglich (meroblastisch)
- => Dotter nimmt an der Furchungsteilung nicht teil
- ungleichmäßige Verteilung des Dotters im Ei (telo-/centrolecithal)

**Partielle Bilateral-furchung**

**Discoidal-furchung**

**Superfizielle furchung**

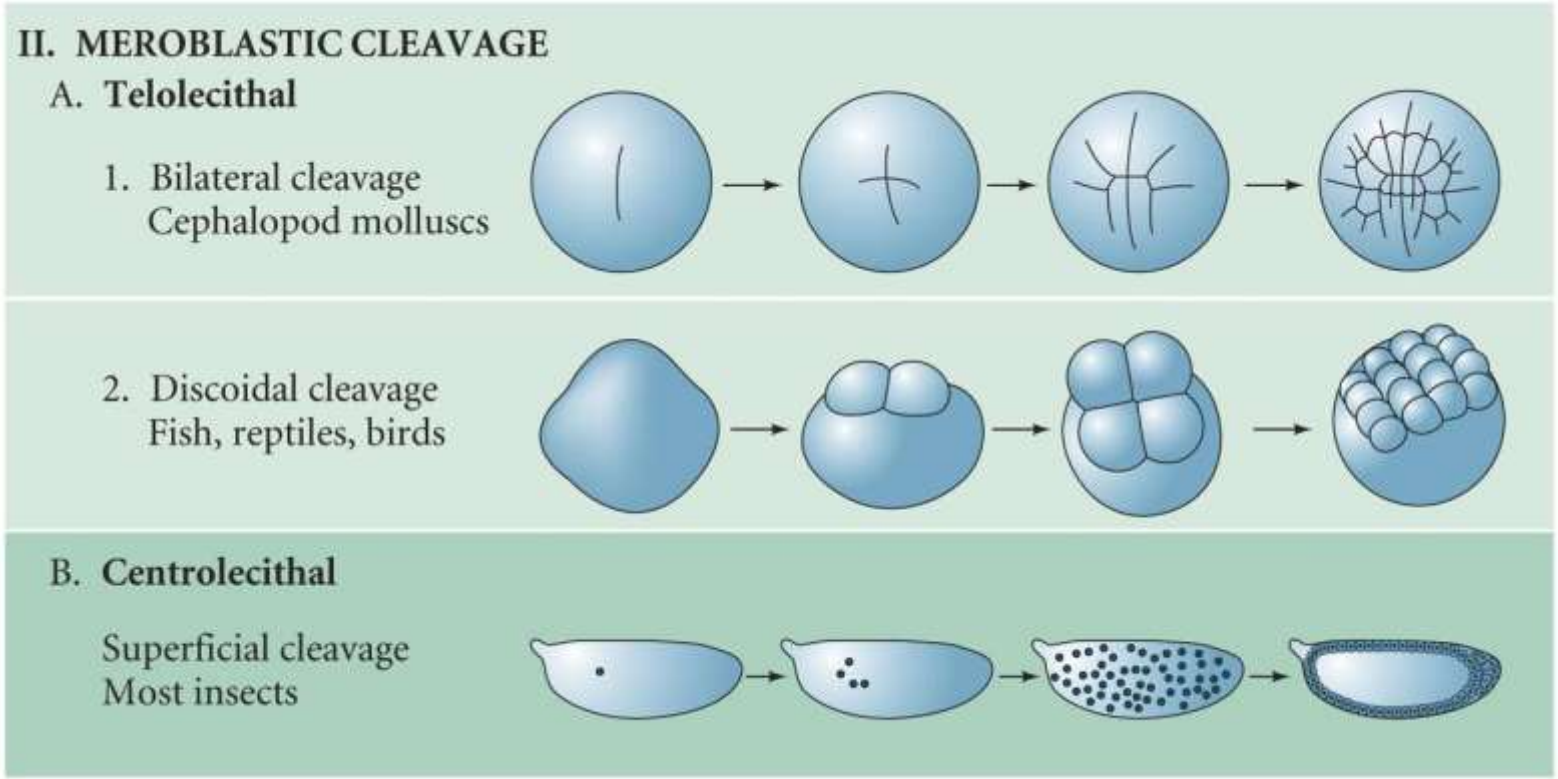



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Radiärfurchung

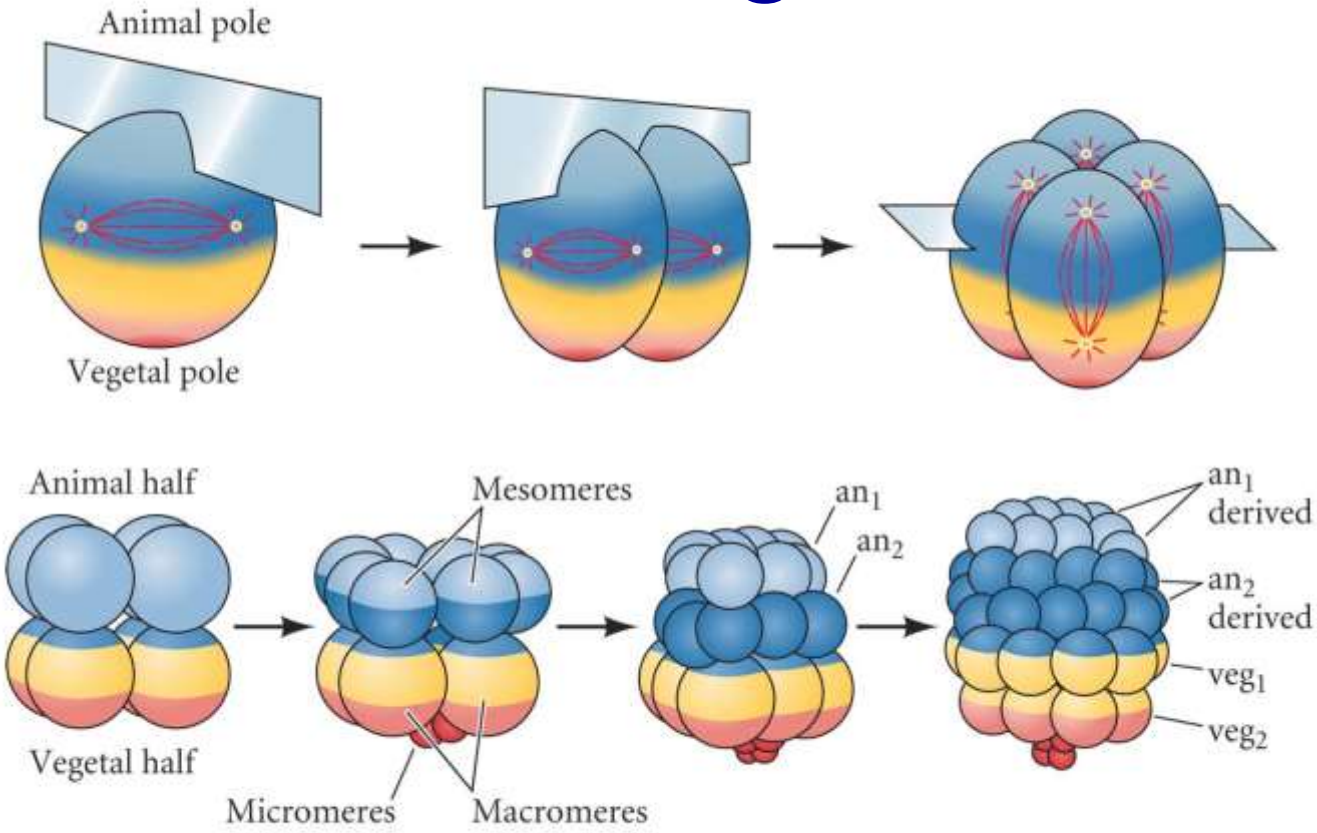



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

- einfachster und ursprünglichster Furchungtyp
- Teilung total (holoblastisch), äqual
- nur bei iso-/oligolecithalen Eiern möglich
- Echinodermata, Branchiostoma

# Inäquale Radiärfurchung

- typisch für **Amphibien**
- **meso- /telolecithale** Eier => Teilung **inäqual**

  (Teilungsachse zum animalen Pol verschoben)

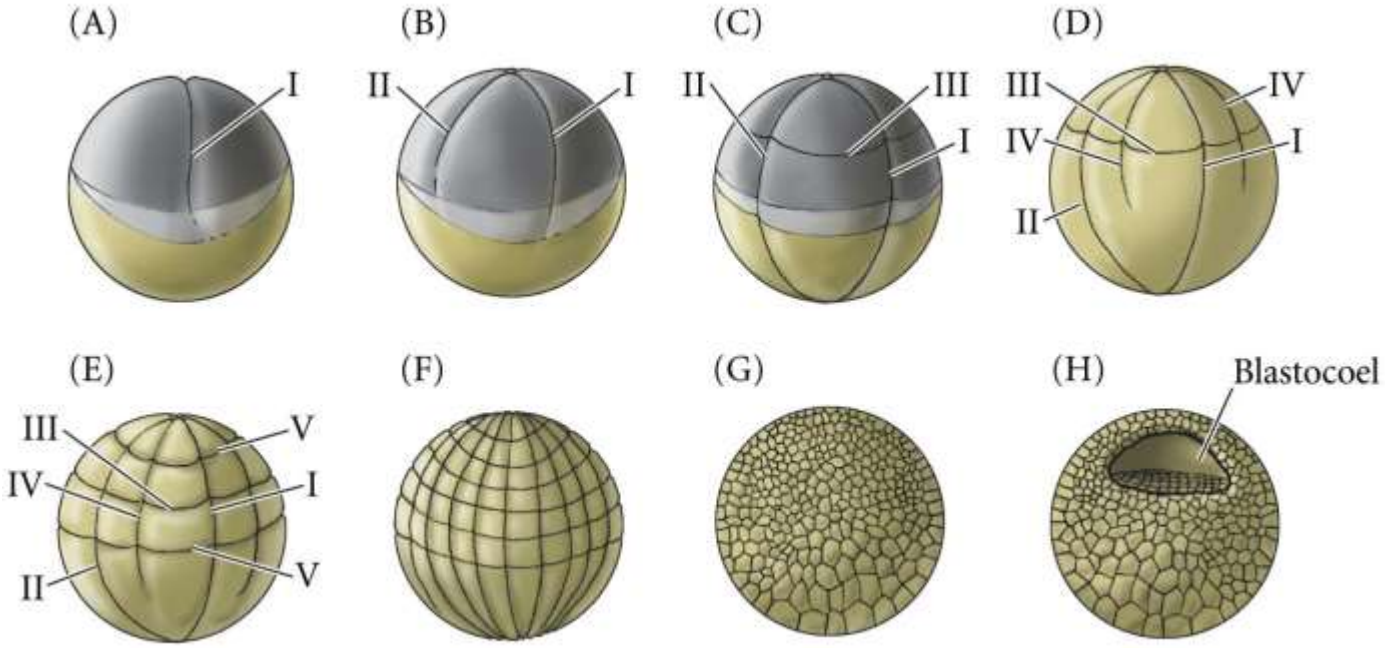
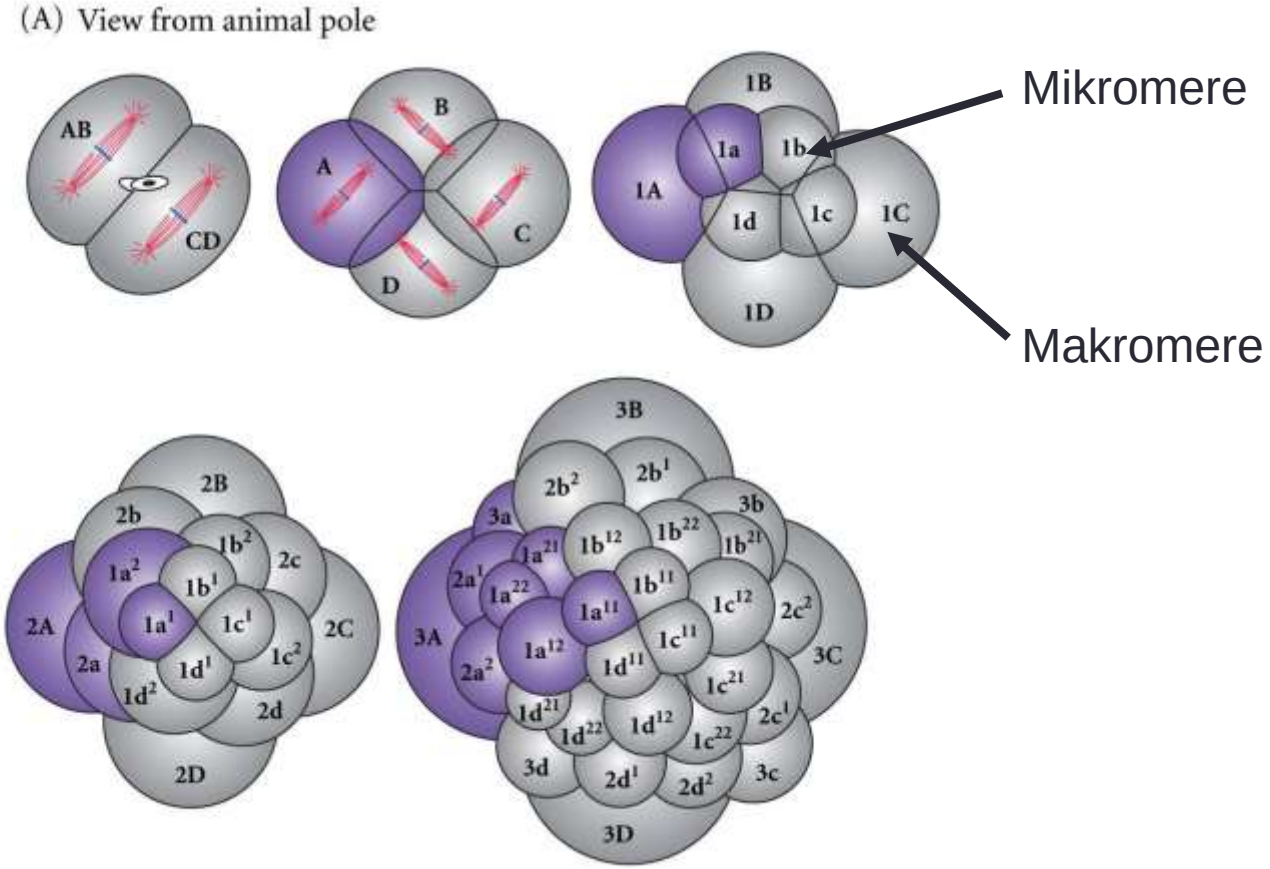



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Spiralfurchung

- eine der folgenden Teilungsspindel ist quer **versetzt** => bildet sich Spirale
- inäqual => Zellen teilen sich nach 2. Teilung ungleichmäßig




DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 8.23 (Part 1) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

# Spiralfurchung

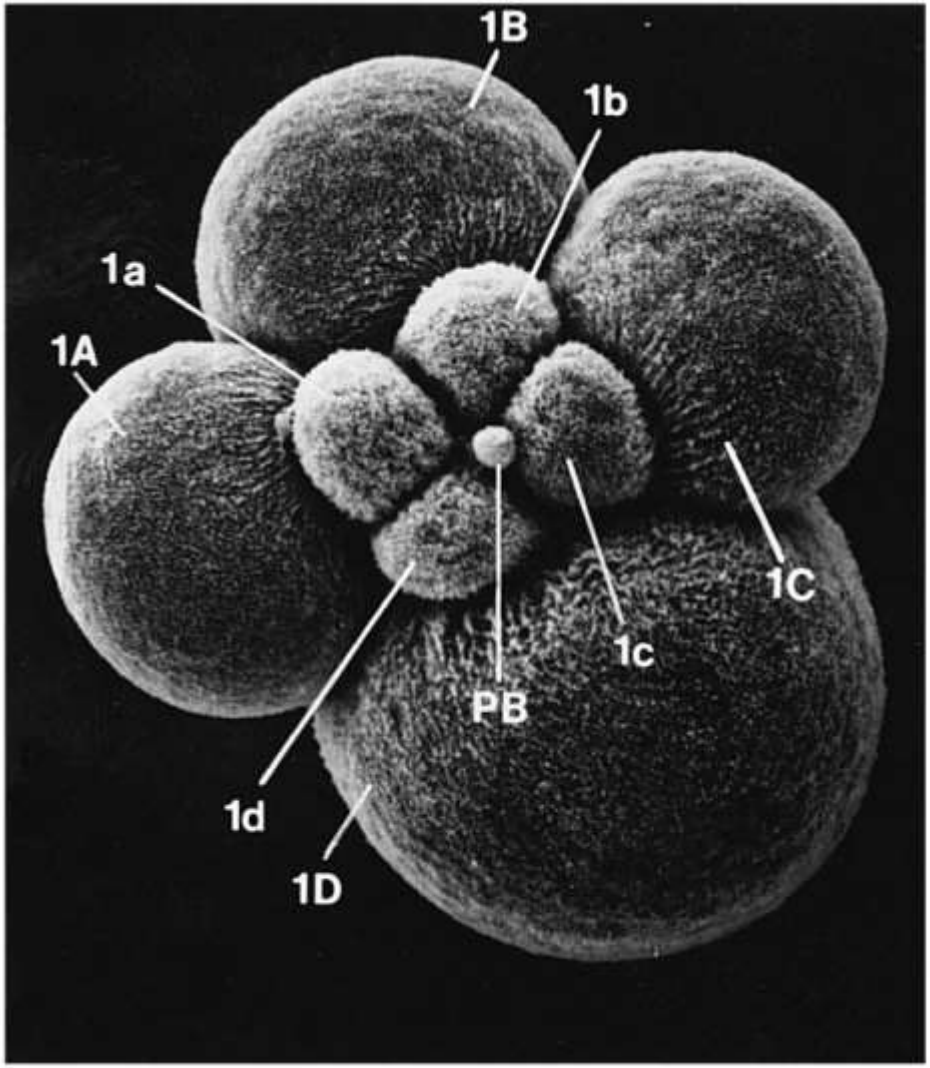
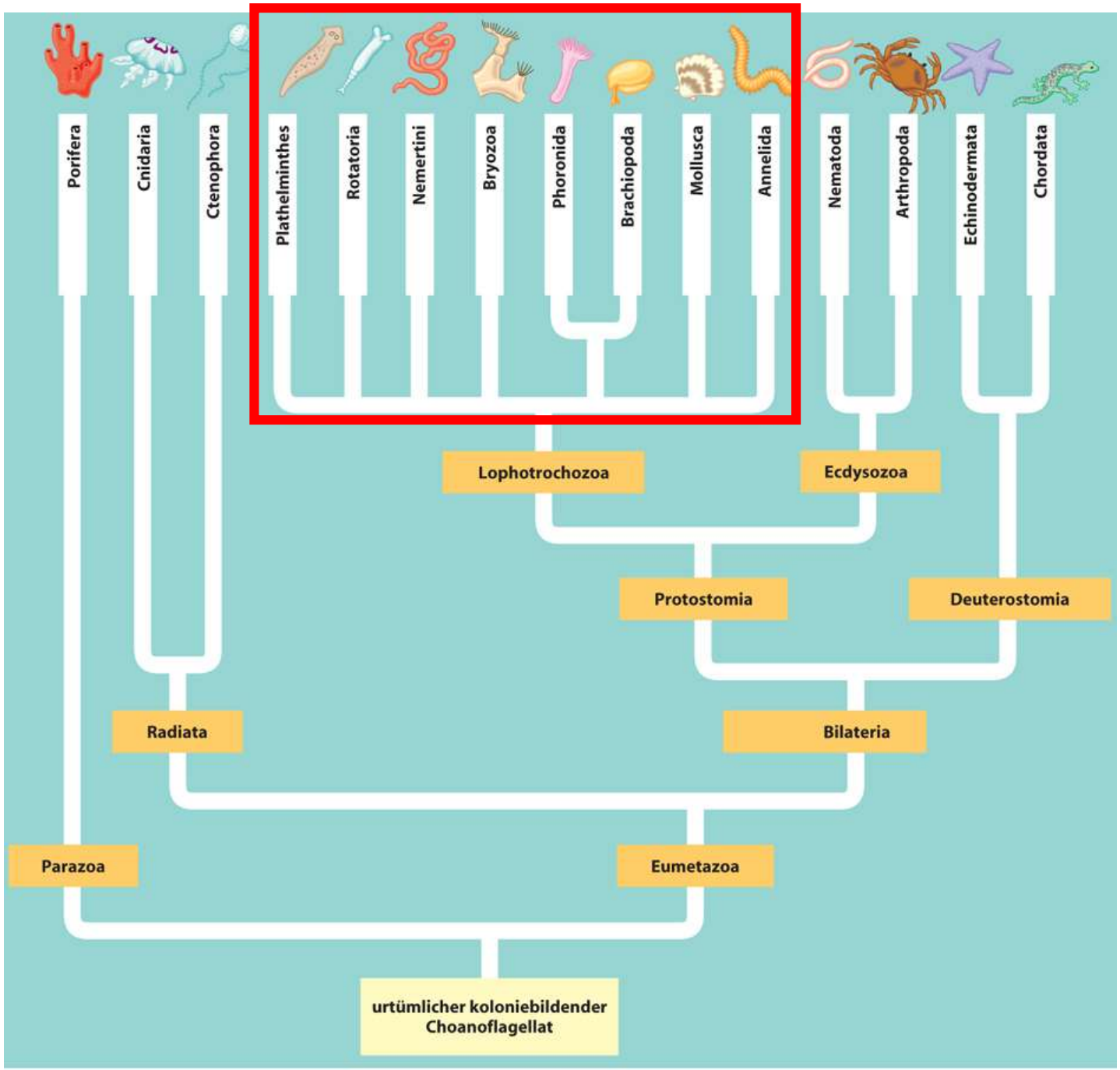



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

- determinierend, stereotyp
- typisch für Plathelminthes, Anneliden und Mollusken (nicht Cephalopoda) => "Spiralia"

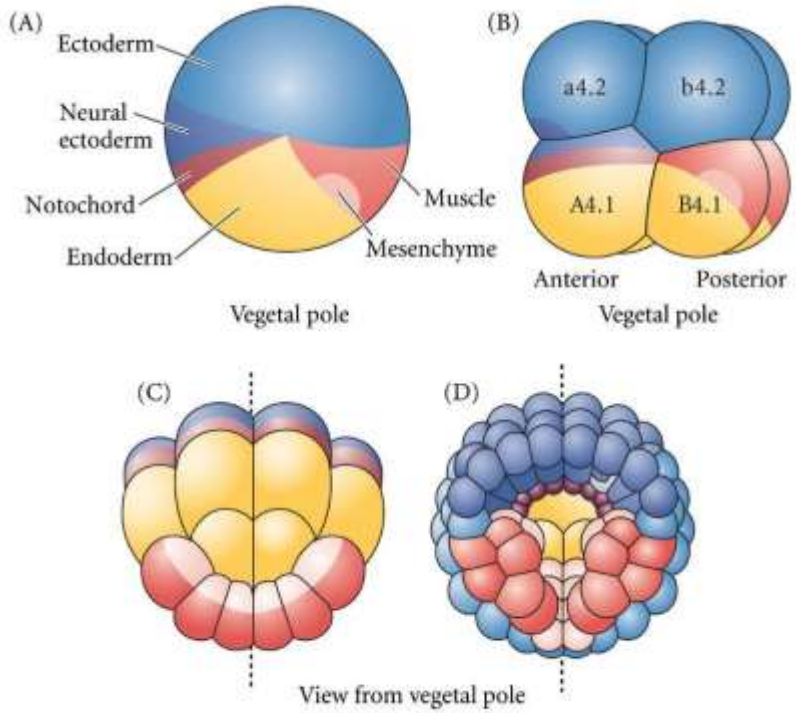


"Spiralia"

© Campbell/Reece, Biologie, 6. Aufl., 2004

# Bilateralfurchung

- typisch für **Tunikaten** (Manteltiere)
- erste **Symmetrieachse** wird früh festgelegt => es gibt eine rechte und eine linke Hälfte des Embryos



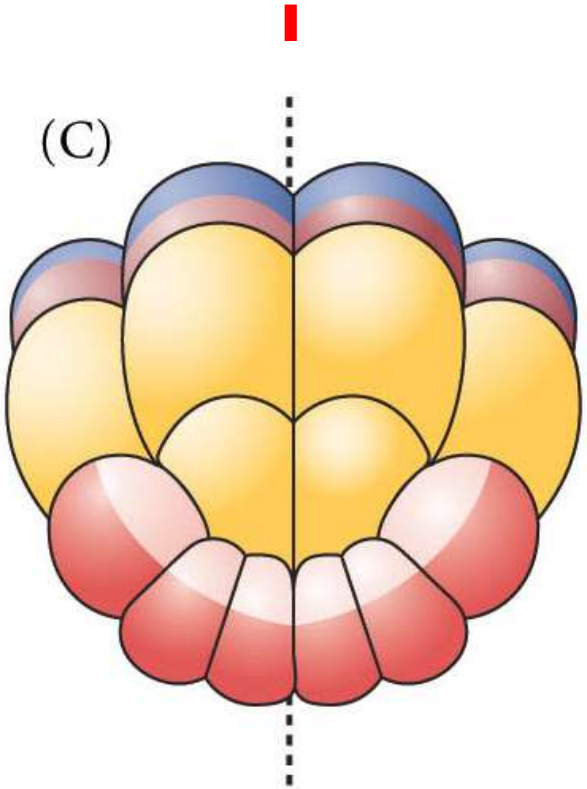




Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Partielle Bilateralfurchung

- in **Cephalopoda** (Kopffüssern)
- poly- /telolecithale Eier
- unvollständige Bilalateralfurchung => Dotter nimmt an der Furchungsteilung nicht teil

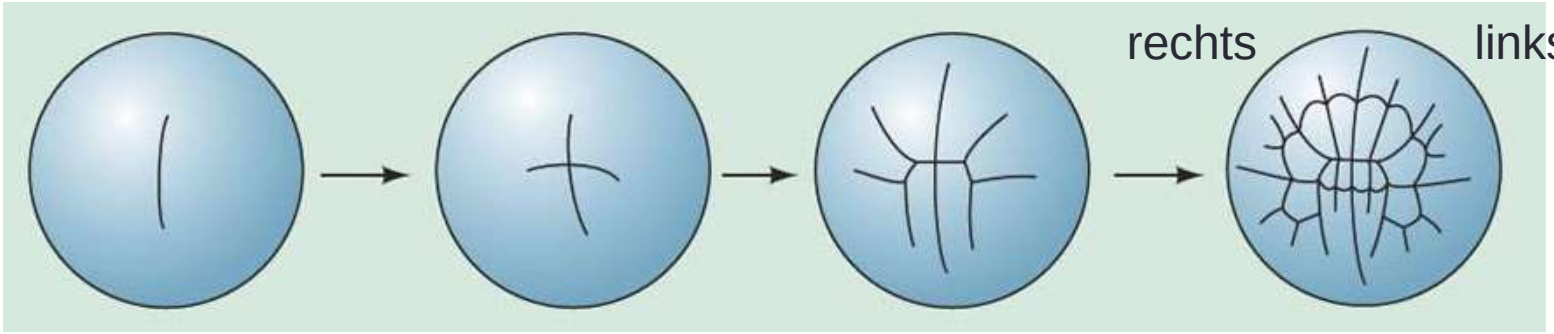



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Rotationalfurchung

- typisch für **Nematoden** und **Mammalia**
- Teilung total und äqual
- **Teilungsebenen** um 90° **versetzt**

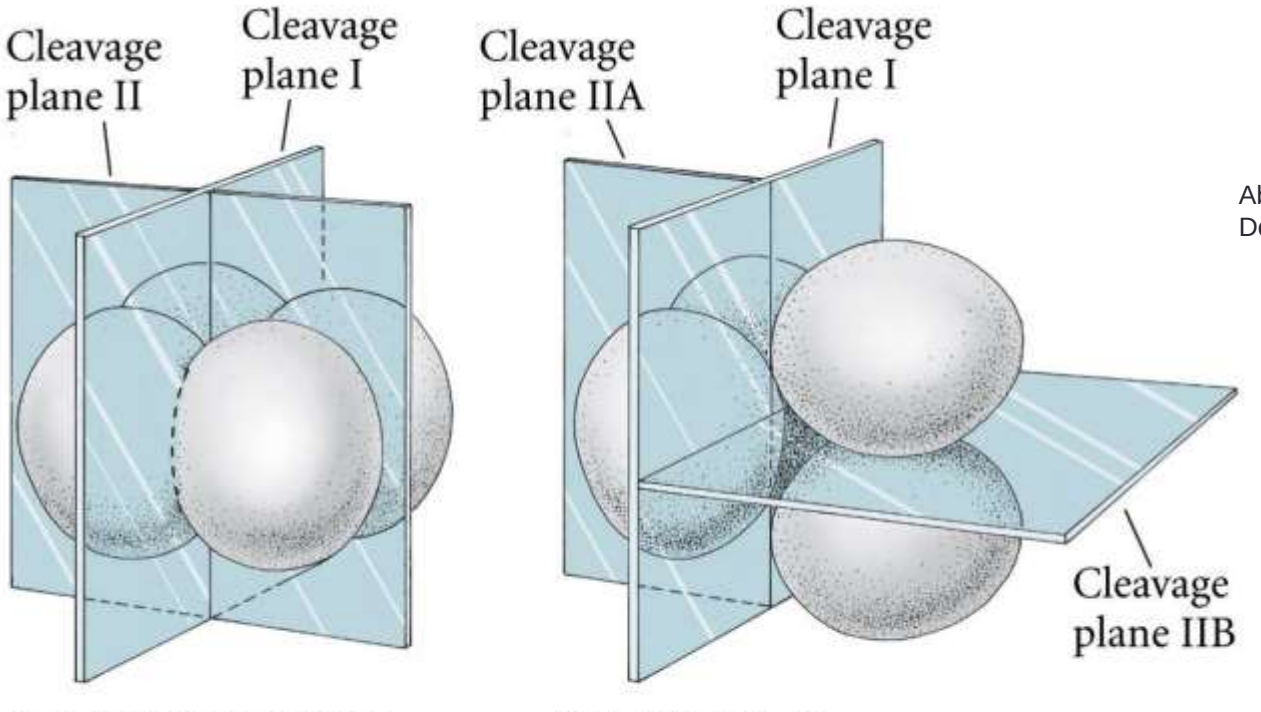


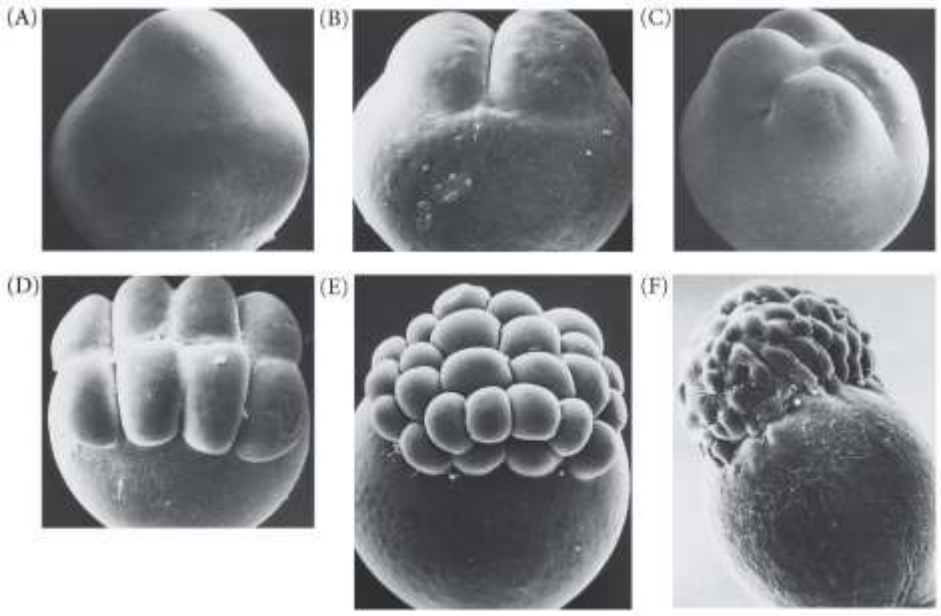

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

Radiärfurchung

Rotationalfurchung

# Discoidalfurchung

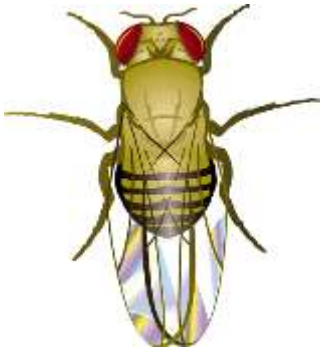
- Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel
- in **extrem telolecithalen** Eiern
- **Keimscheibe** am animalen Pol (liegt Dotter auf)
- Dotter am vegetativen Pol wird nicht gefurcht, Zellgrenzen zum Dotter hin z.T. offen




Furchungsteilungen des Zebrafischs *Danio rerio*

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Superfizielle Furchung



- Insekten, Malacostraca => centrolecithale Eier
- zunächst keine Zellteilungen, sondern nur Kernteilungen
- Zellkerne wandern in Peripherie => syncytiales Blastoderm
  => Zellwände: zelluläres Blastoderm

Furchungsteilungen der Taufliege
*Drosophila melanogaster*

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Furchung Seeigel

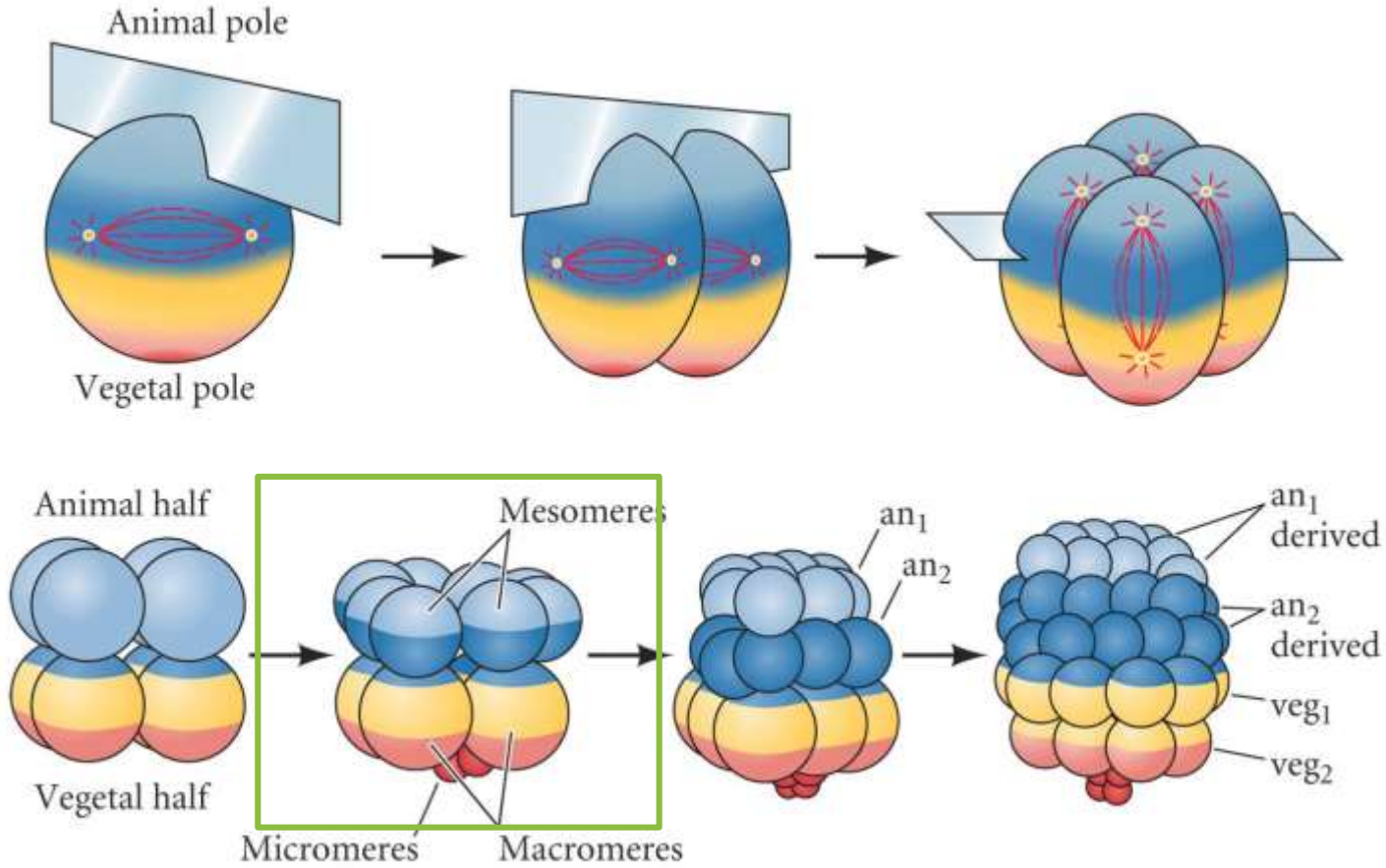



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

Schnelle Teilungen => alle 30 bis 40 min

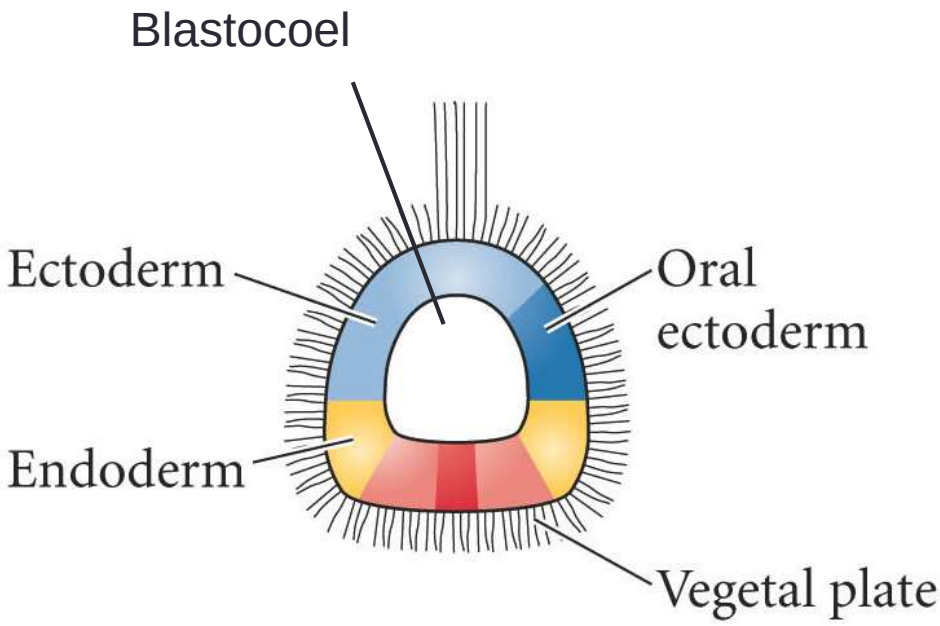
**1. bis 3. Teilung**: **total** (holoblastisch) und **äqual**

**4. Teilung**: **inäqual** => **Mikromere** + **Makromere** + **Mesomere**

ab 4. Teilung: Mikromeren teilen sich verzögert

ab 10. Teilung: Beginn der Transkription ("mid-blastula transition")

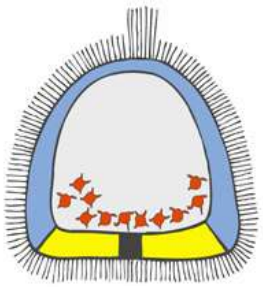
# Ende der Furchung: Blastula



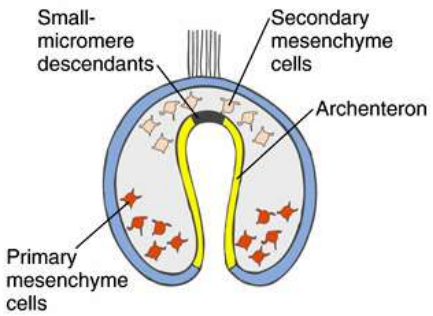

- Blastula: Bewimperte Hohlkugel
- Blastocoel ist mit Flüssigkeit gefüllt
- verhindern vorzeitige Determination

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

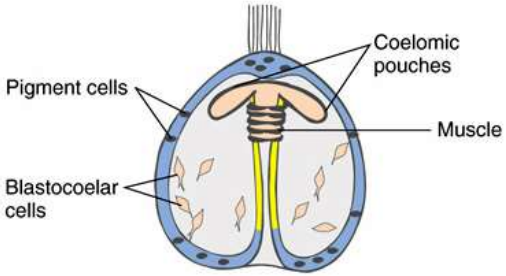
# Gastrulation = Gestaltbewegungen



1




2




3

Verlagerung von Zellen und Geweben in das Innere des Embryos:

**1.** Abkömmlinge der Mikromeren wandern in Blastocoel ein = **primäres Mesenchym** (... => Skelett)

**2 a.** Einstülpen des **Urdarms** (Archenteron) => Bildung des **Urmunds** (Blastoporus)

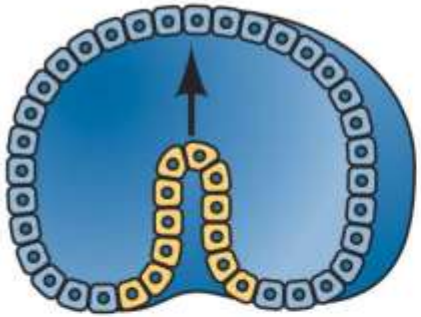
**2 b.** Zellen des vegetativen Pols wandern aus Urdarmdach ins Blastocoel = **sekundäres Mesenchym** (für die weitere Einstülpung verantwortlich)

**3.** Entstehung des Coeloms (sekundäre Leibeshöhle), Muskel

=> dreischichtiger Keim: **Ekto-, Meso, Endoderm**

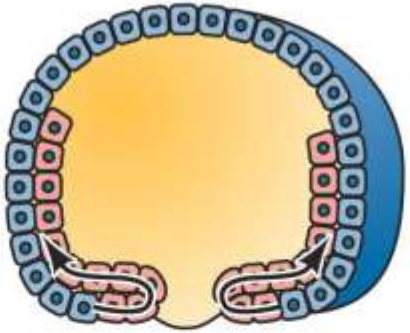
# Gastrulationstypen

## Invagination



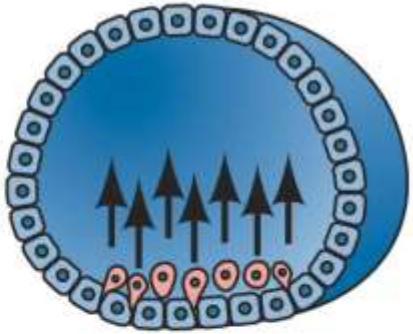
Seeigel (Endoderm)

## Involution



Amphibien (Mesoderm)

## Immigration

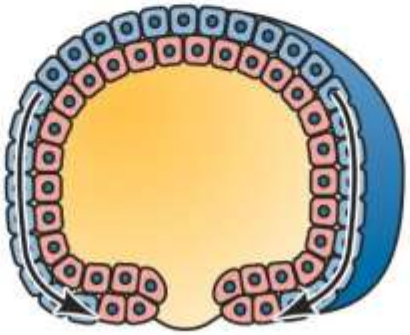


Seeigel (Mesoderm)

## Delamination

Säuger (Hypoblast)

## Epibolie



Amphibien (Ektoderm)

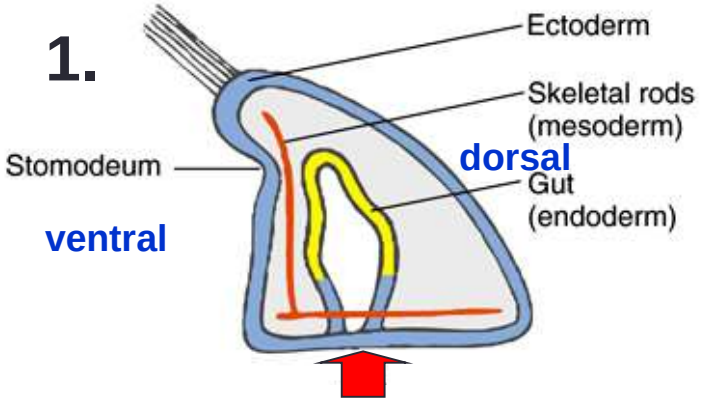
**Gastrulation kann sich unterscheiden:**

1. **Art der Bewegungen**
2. **Welches Keimblatt daran teilnimmt**

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

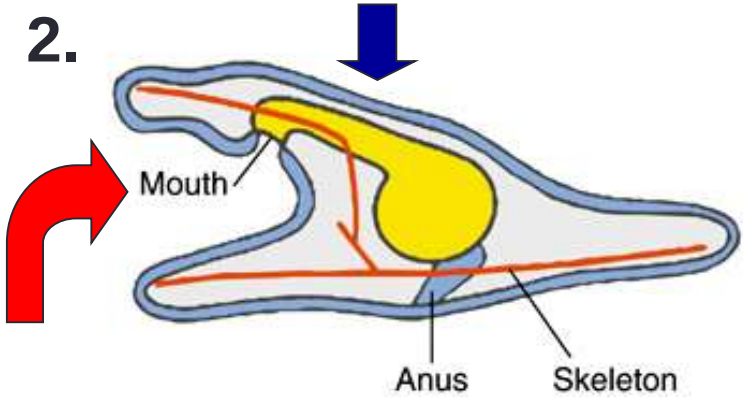
# Seeigel: Entwicklung nach der Gastrulation

**1.**




**Urmund:** wird zum After

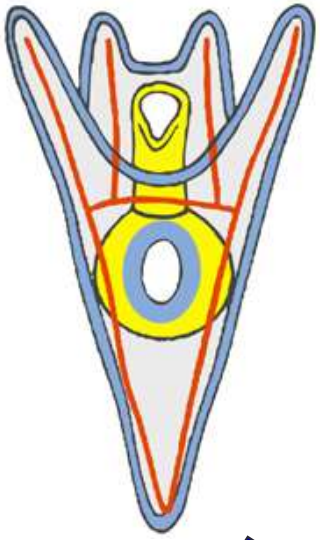
**2.**




**Mund:** bricht neu durch

=> Deuterostomia

**3.**

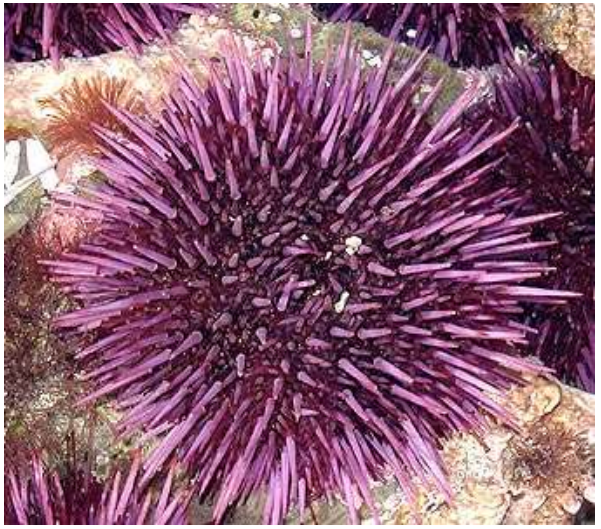


**Pluteus-Larve**

**Meta-morphose**

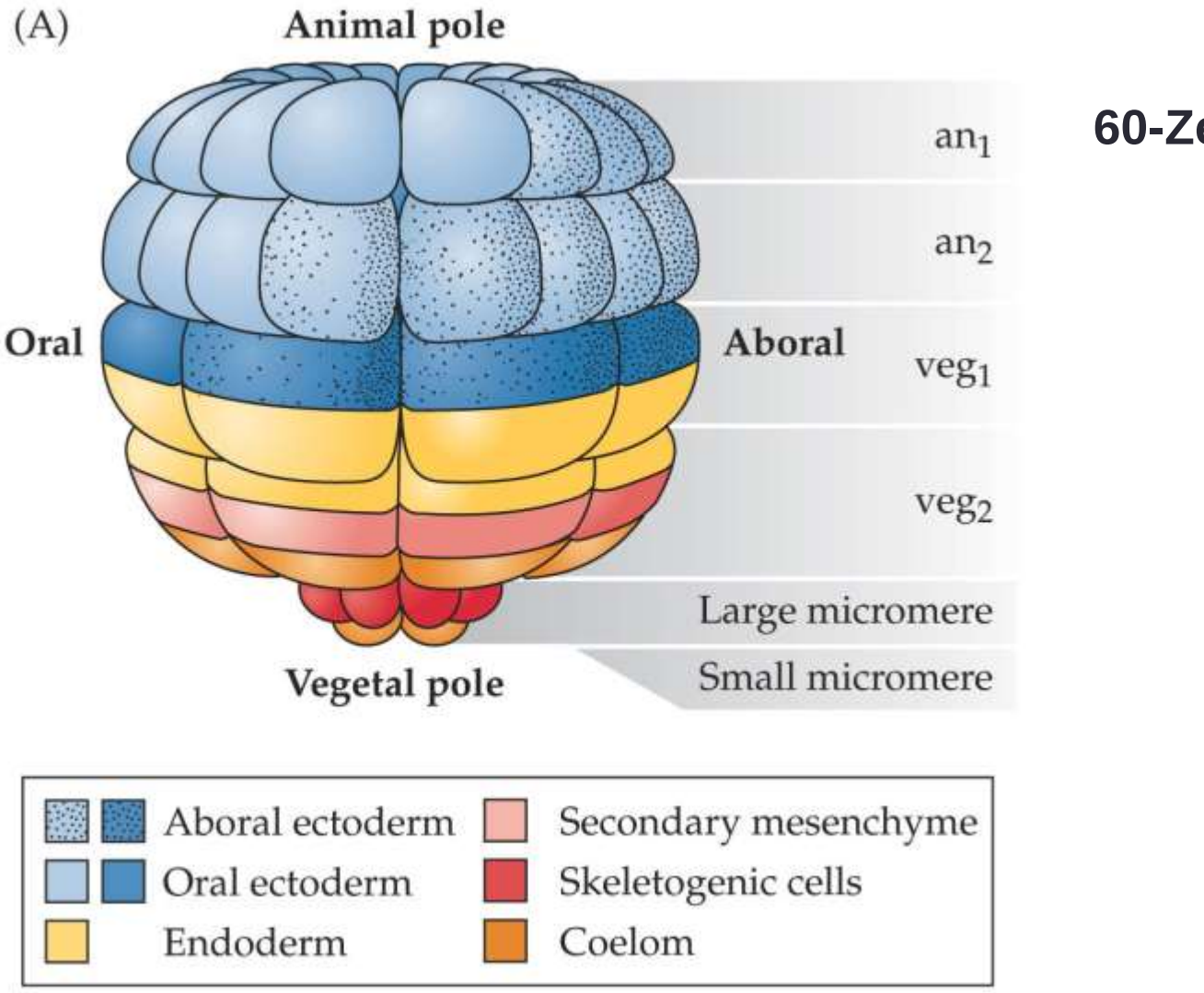
**adulter Seeigel**
**(radiärsymmetrisch)**

**4.**



# Schicksalskarte ("fate map")

anhand von *in vivo* Färbungen




**60-Zellstadium**

DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Eighth Edition, Figure 8.8 (Part 1) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

# Seeigelembryo hat die Fähigkeit zur Regulation

Hans Driesch
(1867-1941)

- prospektive Potenz > prospektive Bedeutung
- => Regulation ist möglich
- => kein Mosaikkeim

**4-Zellstadium:**

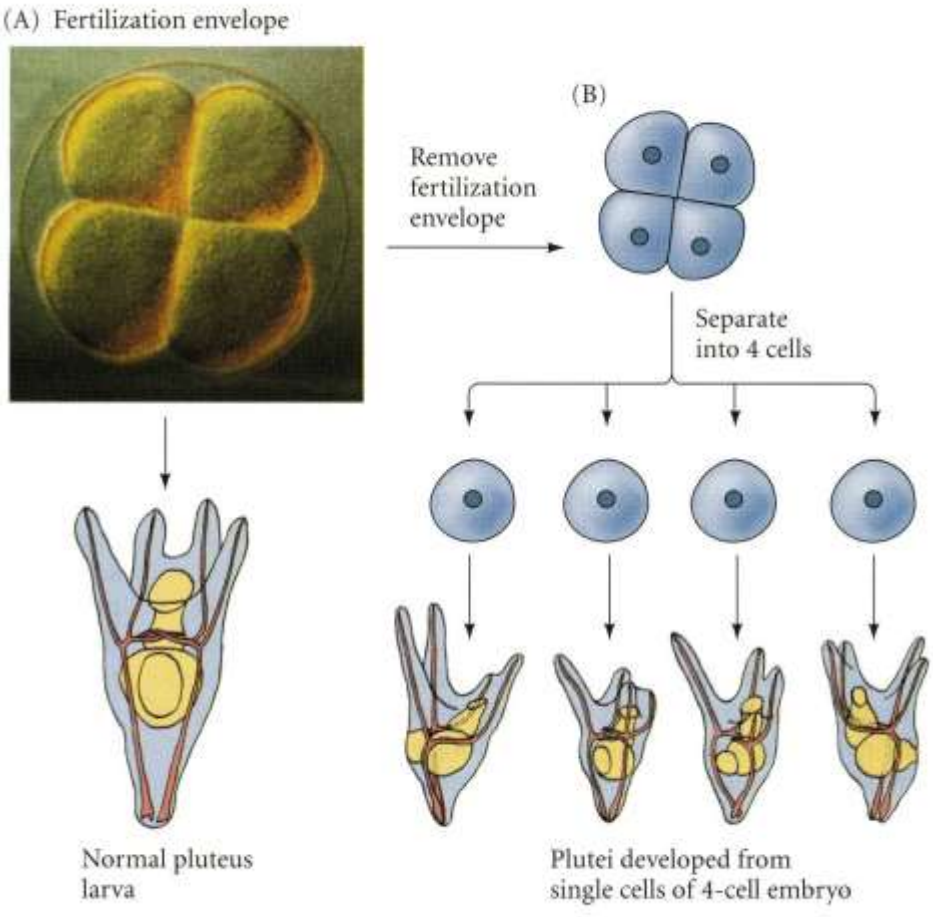
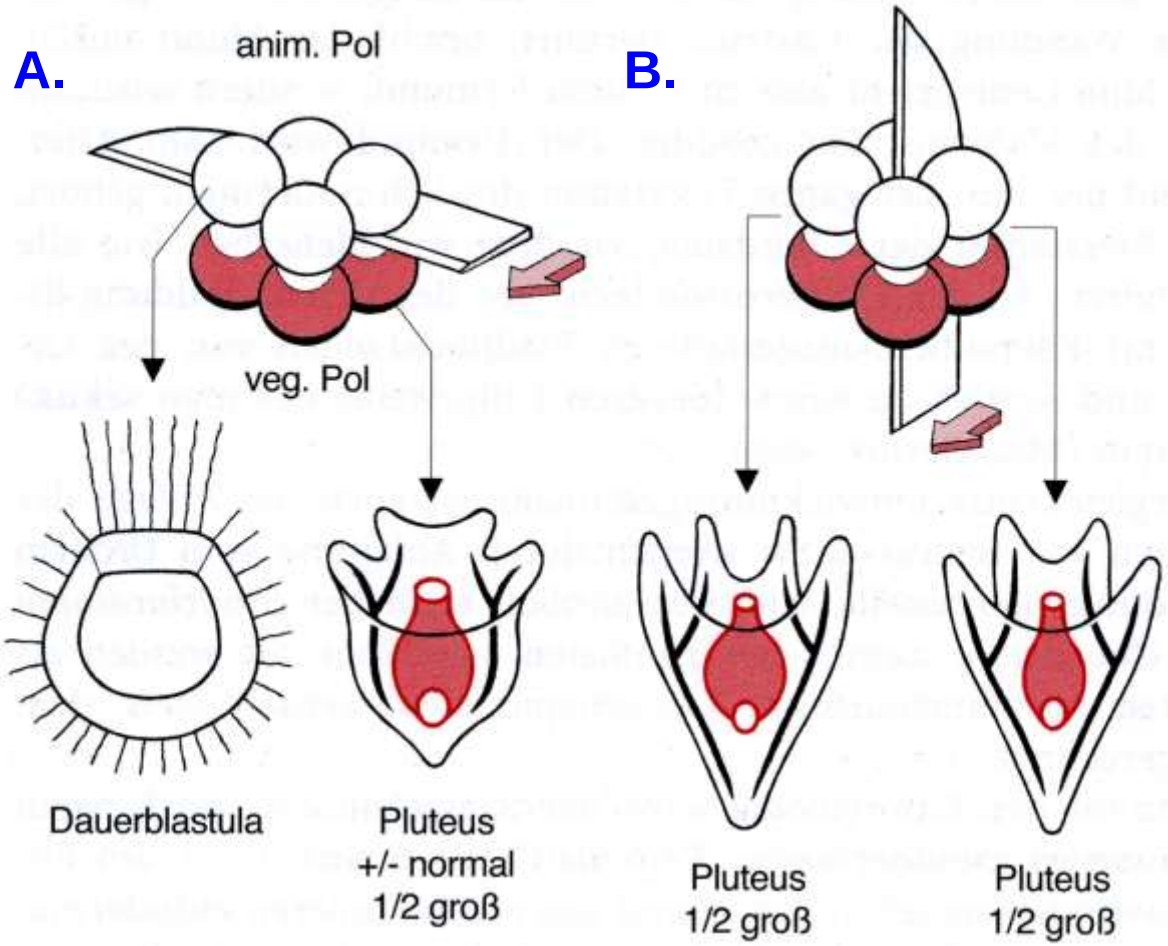



Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Einschränkung der Kompetenz durch Determination

## 8-Zellstadium:



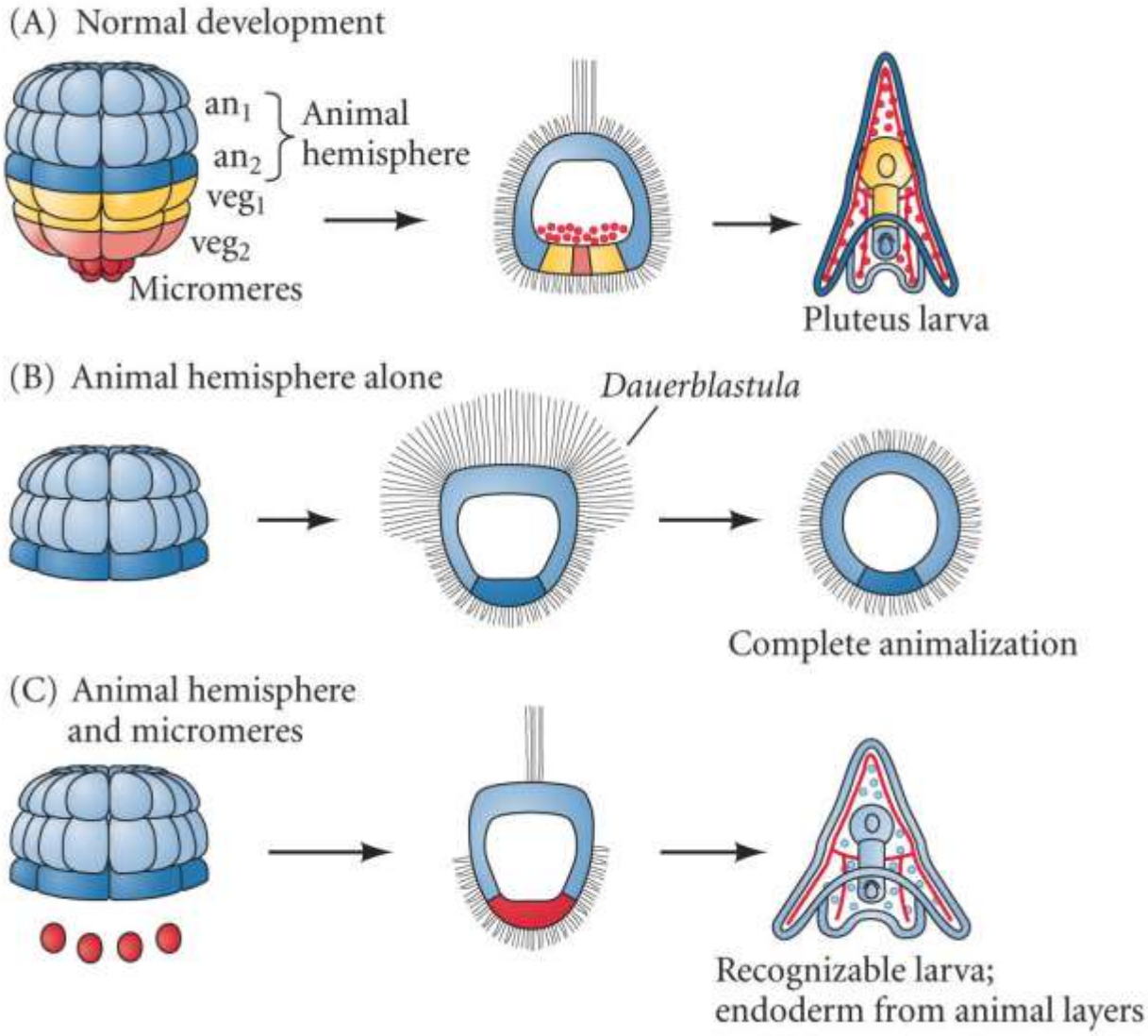

**A.** bei Teilung quer zur A/V-Achse entstehen "defekte" Embryonen

**B.** nur bei Halbierung entlang der animal-vegetativen Achse entsteht kompletter Embryo

**=>** cytoplasmatische Faktoren

Abb. aus: Müller, Hassel: Entwicklungsbiologie, 4. Auflage

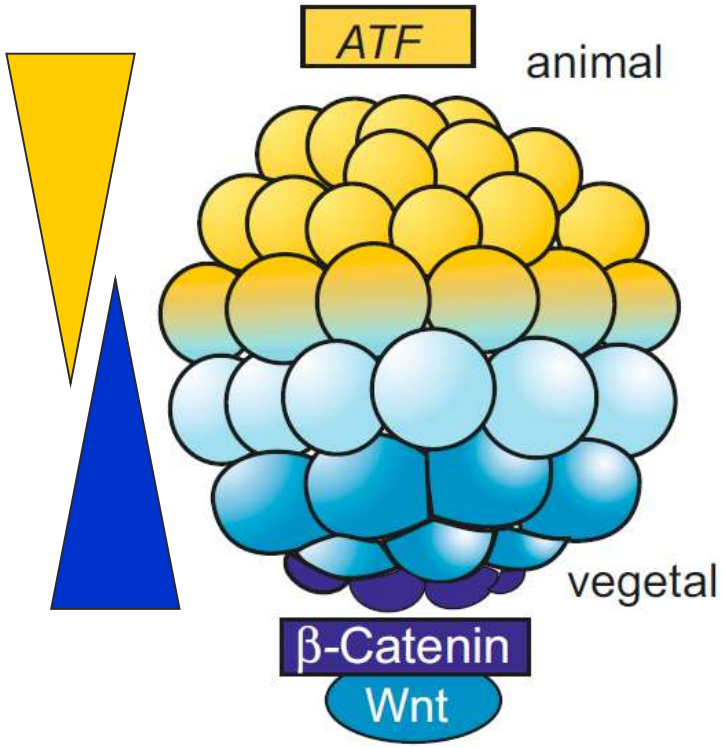
# Mikromeren induzieren Endoderm

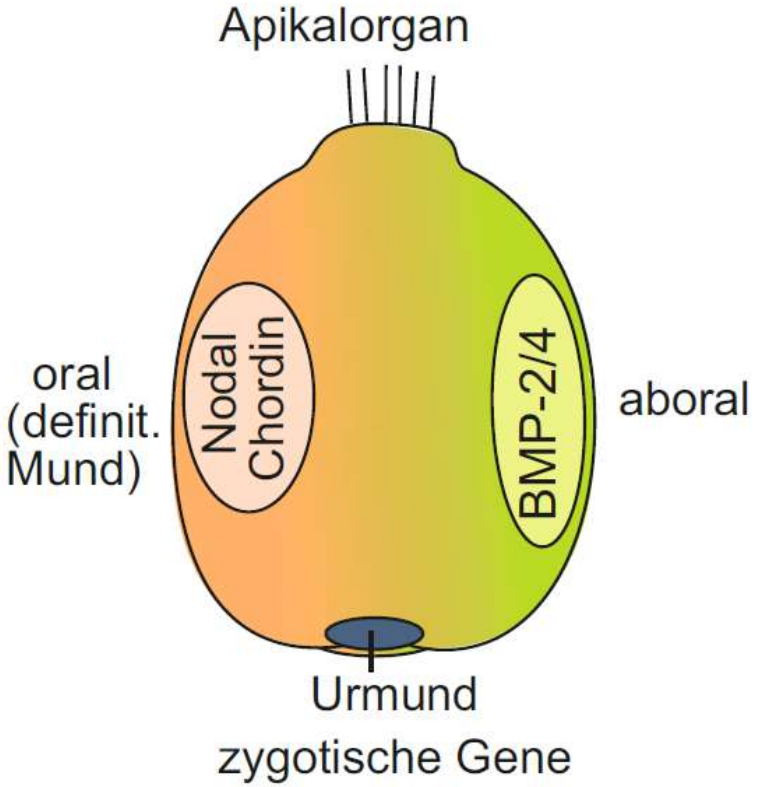



**=> Mikromeren sind in der Lage, die Endodermbildung zu induzieren**

Abb. aus: Gilbert: Developmental Biology, 8th ed.

# Gradienten cytoplasmatische Faktoren bestimmen Körperachsen



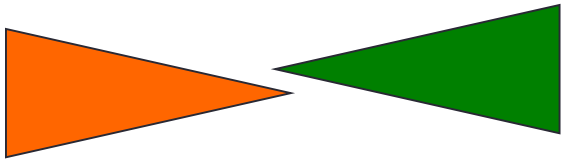



Abb. aus: Müller, Hassel: Entwicklungsbiologie,5. Auflage

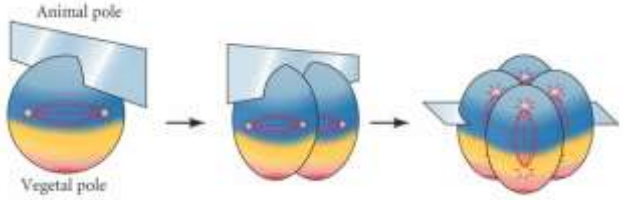
- maternaler + zygotischer Faktoren:

- **animal**: "animalizing transcription factors" (**ATFs**)
- **vegetativ**: **β-Catenin** im ZK => aktiviert "WNT-Signalsystem"

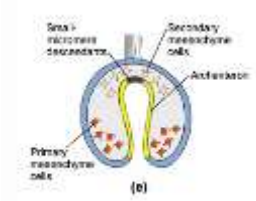
# Einteilung der Ontogenese

Ontogenese = Individualentwicklung

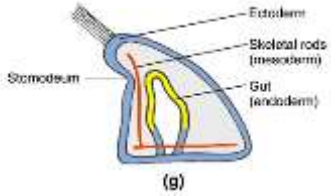
## A. Embryonalentwicklung:




1.) **Furchung:** Zerteilung des Eiraumes in Blastomere => Blastula




2.) **Gastrulation:** Gestaltbewegungen => Gastrula




3.) Ausbildung der Körpergestalt => **Organogenese**

4.) **Differenzierung**

**1-3: Primitiventwicklung**
**4: Definitiventwicklung**

# Einteilung der Ontogenese

## B. Postembryonalentwicklung:

5.) **Larvalentwicklung** (evt. mit Metamorphose)

6.) **Jugendentwicklung** (Wachstum, Geschlechtsreife)

adulter Organismus

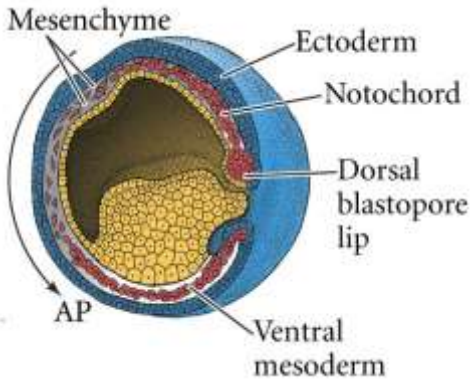
- Phasen können sich überschneiden
- viele verschiedene Typen im Tierreich

# Zusammenfassung

- **Befruchtung:** Beginn der Individualentwicklung
- Modellsystem **Seeigel**
- **Furchung**steilungen: Verschiedene erste Zellteilungen des Embryos
- **Gastrulation**: Gestaltbewegungen

- **Wolpert: Kapitel 5.7 – 5.13, 7.1-7.7, 11.7-11.9**
- **Müller & Hassel: Kapitel 2, 3.1, 9-10**
- **Gilbert: Kapitel 7 + 8**

# Nächste Stunde




- Entwicklung Amphibien + Huhn
- Organogense, Neurulation
- Induktionsprozesse
- Organisator, Hox-Gene

- **Wolpert: Kapitel 3.1-3.3, 3.5-3.8, 3.10- 3.21**
- **Müller & Hassel: Kapitel 4.1 + 4.2**
- **Gilbert: Kapitel 10 + 12**